



C I Q U I B I C

# **Cáncer de Mama**

## ***Efecto del micro-medioambiente tumoral***

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas

**Lic. en Química Andrés Marcos Castellaro**

Director de Tesis: Dr. Germán Alejandro Gil

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba

CIQUIBIC (UNC-CONICET)

Departamento de Química Biológica “Ranwel Caputto”

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Marzo de 2018

CÓRDOBA, ARGENTINA

### **Miembros de la comisión de tesis**

Dra. Susana Genti

Dra. Ana María Cabanillas (Q.E.P.D.)

Dra. Carolina L. Montes

Dra. Claudia E. Sotomayor

### **Evaluador externo**

Dr. Javier Enrique Girardini Brovelli

Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario.

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis por su apoyo y consejos. Por haberme tenido paciencia todos estos años. Haber trabajado juntos todo este tiempo fue un gran aprendizaje y crecimiento para mí. También quiero agradecer a Bety por haberme abierto las puerta del laboratorio varios años atrás cuando cursando su materia “Biológica Especial” conocí su grupo de trabajo del cual terminé siendo parte. Muchas gracias Bety por tu generosidad.

En segundo lugar quisiera agradecer a las instituciones que hicieron posible que pudiera realizar este doctorado. Al CIQUIBIC y al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas por haberme acobijado todo este tiempo en sus instalaciones. A las autoridades, investigadores y personal no docente que hacen que esta casa crezca y mejore día a día. Al CONICET y la Agencia (ANPCyT) por el apoyo económico recibido y por la financiación para poder llevar a cabo las tareas de investigación.

En tercer lugar agradezco a mi comisión de tesis. A la Dra. Susana Genti, la Dra. Ana Cabanillas (Q.E.P.D.) y la Dra. Carolina Montes por sus aportes y críticas constructivas en las reuniones anuales. Tuve la suerte de hacer el curso de “Transducción de señales” que organizaba Ana junto al Dr. Omar Coso, un curso que disfruté mucho. Gracias Ana porque donde me veías te acordabas de mí y me preguntabas como iba con mi investigación y siempre había un palabra de aliento de parte tuya. Gracias Susana por tu gentil ayuda en la parte burocrática de presentación de papeles. También agradezco a la Dra. Claudia Sotomayor, quien tras el triste fallecimiento de Ana, fue su reemplazo estos últimos meses contribuyendo en la elaboración de este escrito junto con Susana y Carolina. Sus aportes hicieron que este trabajo mejore sustancialmente.

A todos mis compañeros del laboratorio, a los que están actualmente y a los que estuvieron. A Fabi, Andrés, Gabi y Rubén por esa ayuda del comienzo cuando recién entraba al laboratorio y necesitaba preguntar todo, todo el tiempo. Gracias Lu por tu ayuda y consejos, especialmente con los papeles y recordatorios de las fechas importantes. Mi clave de sigeva sigue siendo "GraciasLucia.....". A Cesar por tu calidad de gente, generosidad y compañerismo. A Cele por haberme ayudado con los experimentos estos últimos meses y por haberme soportado a mí y mi mesita. Ella fue mi soporte todos estos años (la mesita). A Ana con quien he compartido buenas charlas y consejos, a Aye con quien también trabajé este último tiempo, y a Trini, la última en incorporarse a esta gran familia científica. Una de las mejores cosas que me quedan de este doctorado es haberlos conocido y haber compartido muchos buenos momentos con ustedes.

A nuestros vecinos de laboratorio Sabri, Gonza, Consu, Luz y Quío con quienes siempre compartimos uso de equipos y reactivos, por su buena onda y porque siempre son nuestra primera opción cuando nos quedamos sin café. Al personal de bioterio, especialmente a Laura y Rosa por el compromiso con el que realizan su trabajo, porque siempre que necesité ayuda con el cuidado de los animales estuvieron presente. A Susana y Gabriela que siempre fueron muy atentas con migo al momento de descongelar o congelar células, con el material de cultivo y demás tareas del día a día.

A mis dos grandes amigos Julio y Flor, dos personas muy especiales con quien he compartido muchos buenos momentos, charlas y juntadas, porque son incondicionales y sé que siempre puedo contar con ustedes.

A mi familia que hizo un gran esfuerzo para que yo pudiera venir a estudiar a esta ciudad y recibirme de Licenciado en Química. A mi Mamá y mis hermanos Gustavo y Gabriel por su apoyo constante. A mi tía Sedelina porque siempre se preocupa por mí y no hay semana que no llame para preguntarme como estoy,

gracias por todo tu cariño. A mi tío Fernando y su familia por las charlas y comidas que solemos compartir cuando estoy por Morteros, en las cuales me la paso muy bien y porque siempre están presentes.

Agradezco a Jehová que es mi refugio y sostén cuando flaqueo, porque no todo nos es posible comprender y racionalizar, pero de su mano siempre encuentro paz.

Una etapa muy linda de mi vida se termina, otra comienza. Simplemente gracias a todos de corazón.

*A mi padre, que se fue demasiado pronto, por haberme enseñado las cosas que realmente importan en esta vida.*

*A mi abuela Esterina, maestra de alma, por haber sido mi profesora durante mi niñez y adolescencia.*

*Gracias a ambos por haberme dado todo lo que estaba a su alcance y más aún.*

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b><u>CAPÍTULO 1</u> .....</b>	<b>7</b>
<b>EFFECTO DEL MICRO-MEDIOAMBIENTE TUMORAL MODULADO POR MACRÓFAGOS EN CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>7</b>
INTRODUCCIÓN .....	8
<i>Rasgos anatómicos de la glándula mamaria .....</i>	<i>8</i>
<i>Cáncer de mama y el micro-medioambiente .....</i>	<i>9</i>
<i>Aspectos generales sobre el rol del sistema inmune en tumores sólidos .....</i>	<i>10</i>
<i>Macrófagos asociados a tumores .....</i>	<i>12</i>
<i>Implicancias de un ambiente proinflamatorio en el cáncer .....</i>	<i>15</i>
<i>TNF-<math>\alpha</math> e IL-6 en el micro-medioambiente tumoral .....</i>	<i>16</i>
<i>Receptores estrogénicos.....</i>	<i>21</i>
<i>Correguladores transcripcionales.....</i>	<i>23</i>
<i>Cáncer de mama ER+ y el tratamiento endocrino .....</i>	<i>24</i>
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
RESULTADOS .....	27
<i>Macrófagos condicionados promueven la proliferación de células de cáncer de mama ER<math>\alpha</math>+ de una manera independiente de estradiol.....</i>	<i>27</i>
<i>Macrófagos condicionados incrementan la capacidad migratoria e invasiva de células MCF-7. ....</i>	<i>31</i>
<i>Los TAMs favorecen una mayor tasa de crecimiento y resistencia endócrina en tumores de xenoinjerto formados a partir de células MCF-7. ....</i>	<i>33</i>
<i>TNF-<math>\alpha</math> induce la expresión de los genes ciclina D1 y c-Myc en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados. ....</i>	<i>39</i>
<i>Macrófagos condicionados incrementan el reclutamiento de p65 y ER-<math>\alpha</math> en el promotor de ciclina D1 y c-Myc en células MCF-7 estimuladas con TNF-<math>\alpha</math> .....</i>	<i>42</i>
<i>Rol de NF-kB en la proliferación de células MCF-7 mediada por macrófagos condicionados.....</i>	<i>47</i>

<i>Rol de la vía de IL-6/STAT3 en la proliferación de células MCF-7 mediada por macrófagos.....</i>	<i>51</i>
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	74
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>76</b>
<b>EFFECTO DE LAS MICRO-CALCIFICACIONES DE OXALATO DE CALCIO EN CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>76</b>
INTRODUCCIÓN.....	77
OBJETIVO GENERAL.....	79
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	79
RESULTADOS .....	80
<i>Los niveles de oxalato se encuentran incrementados en muestras de tumores mamarios. ....</i>	<i>80</i>
<i>El oxalato induce proliferación en células epiteliales de mama. ....</i>	<i>81</i>
<i>El oxalato induce sobre-expresión de c-Fos en células MCF-7. ....</i>	<i>83</i>
<i>El oxalato induce la formación de tumores en ratones Nu/Nu. ....</i>	<i>87</i>
<i>Análisis de los tumores generados por el oxalato. ....</i>	<i>90</i>
DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES.....	96
<b>CONCLUSIONES GENERALES SOBRE EL MICRO-MEDIOAMBIENTE TUMORAL .....</b>	<b>97</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>99</b>
CAPÍTULO 1 .....	99
<i>Cultivos celulares.....</i>	<i>99</i>
<i>Transfección de células MCF-7 con los plásmidos que expresan IκBα-SR., ERα o ERα-S118A.....</i>	<i>99</i>
<i>ARN pequeño de interferencia (siRNA) .....</i>	<i>100</i>
<i>Cultivo de macrófagos primarios humanos .....</i>	<i>100</i>
<i>Diferenciación y condicionado de macrófagos .....</i>	<i>101</i>
<i>Medio condicionado de macrófagos y co-cultivo.....</i>	<i>101</i>
<i>Ensayos de proliferación .....</i>	<i>102</i>
<i>Ensayo de formación de colonias .....</i>	<i>102</i>
<i>Ensayo de migración .....</i>	<i>103</i>
<i>PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....</i>	<i>103</i>



<i>Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)</i> .....	104
<i>Determinación de IL-6 y TNF-<math>\alpha</math> en el medio de cultivo</i> .....	106
<i>Determinación de IL-6 en muestras de tejido</i> .....	107
<i>Determinación de p-STAT3 y p-ERK-1</i> .....	108
<i>Determinación de p-ER<math>\alpha</math> (S118) por ELISA</i> .....	109
<i>Array de anticuerpos</i> .....	110
<i>Experimento in vivo con ratones</i> .....	112
<i>SDS-PAGE y Western Blot</i> .....	113
<i>Análisis estadístico</i> .....	113
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	115
<i>Experimento in vivo con ratones</i> .....	115
<i>Obtención de muestras humanas, aspectos legales y éticos</i> .....	116
<i>Macrodissección de las muestras de tejido</i> .....	116
<i>Inmunohistoquímica</i> .....	116
<i>Determinación de oxalato</i> .....	118
<i>Cultivos celulares</i> .....	118
<i>Homogenatos celulares para análisis de proteína</i> .....	118
<i>Homogenato de tejido para análisis de proteína</i> .....	119
<i>Cuantificación de proteínas</i> .....	119
<i>SDS-PAGE y Western Blot</i> .....	119
<i>RT-PCR cuantitativa o en tiempo real</i> .....	120
<i>Ensayo de proliferación celular</i> .....	121
<i>Análisis estadísticos</i> .....	121
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	123

## Resumen

En este trabajo se estudia la influencia que tiene el micro-medioambiente del tejido mamario en la iniciación y desarrollo de tumores de mama desde dos puntos de vista diferentes.

El primer capítulo de esta tesis está enfocado al estudio del proceso de intercomunicación que ocurre entre células tumorales humanas de mama positivas para el receptor de estrógenos (ER+) y macrófagos, a través de diferentes mediadores moleculares solubles. Los macrófagos asociados al tumor (TAMs) tienen la capacidad de influir sobre diferentes aspectos claves de las células neoplásicas como son la proliferación, migración, capacidad invasiva y de supervivencia.

Frente a tumores de mama ER+ es muy común en la clínica la utilización de inhibidores de dicho receptor como tratamiento adyuvante. Pero en muchos casos, tumores que inicialmente responden favorablemente al tratamiento con inhibidores del ER luego se vuelven resistentes. En base a los resultados obtenidos en esta tesis, los macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$ , al interaccionar con las células tumorales de mama ER+, pueden provocar resistencia a los tratamientos endocrinos dirigidos contra el ER. La interacción entre las células de cáncer de mama ER+ con macrófagos produce el incremento de varias citocinas proinflamatorias en el micro-medioambiente tumoral, las cuales activan vías de señalización claves en las células epiteliales de mama que inducen proliferación de un modo independiente al estímulo con 17 $\beta$ -estradiol. Se describe gran parte de este mecanismo en el cual TNF- $\alpha$  e IL-6 cumplen un rol fundamental activando los factores de transcripción NF-kB y STAT3. Estos dos factores de transcripción junto al ER $\alpha$  formarían un nuevo complejo transcripcional capaz de inducir proliferación a través de la expresión de genes como *ciclina D1* y *c-Myc*. Para que esto suceda, ER $\alpha$  debe activarse de una forma alternativa independiente de ligando, y ERK-1 sería la quinasa involucrada en este proceso.

Por otra parte, el segundo capítulo de esta tesis se avoca al estudio de los posibles efectos cancerígenos del oxalato sobre células epiteliales de mama. Se cree que la principal fuente de oxalato en el tejido mamario es de origen metabólico aunque se conoce muy poco acerca de este proceso. El oxalato puede encontrarse en forma soluble como ion libre o en forma sólida al formar sales muy poco solubles con cationes divalentes, como es el caso de los cristales de oxalato de calcio que dan origen a gran parte de las micro-calcificaciones en el tejido mamario.

Se encontró que el oxalato libre tiene la capacidad de inducir proliferación en diferentes líneas celulares epiteliales de mama. Además, el oxalato también fue capaz de inducir la expresión del proto-oncogen *c-fos* en células MCF-7, el cual forma parte de los conocidos genes de expresión temprana. Esto también se observó a nivel de proteína, las células MCF-7 expresaron altos niveles de c-fos una hora y media después de ser estimuladas con oxalato.

La proteína c-fos puede inducir proliferación actuando como factor de transcripción AP-1 al heterodimerizar con proteínas de familia de jun. Esto sugiere que el oxalato libre en solución tiene la capacidad de producir ciertos cambios en la expresión de algunos genes claves involucrados en la proliferación.

Finalmente se demostró en un modelo *in vivo* que la presencia de oxalato libre en el micro-medioambiente de la mama de ratones Nu/Nu tiene la capacidad de producir tumores altamente agresivos e indiferenciados con características de un fibrosarcoma. La velocidad con la que se formaron los tumores fue directamente proporcional a la concentración de oxalato libre en el tejido mamario.

# Abstract

In this work we study the influence of the micro-environment of breast tissue on the initiation and development of breast tumors from two different points of view.

The first chapter of this thesis is focused on the study of the intercommunication process that occurs between human breast tumor cells positive for the estrogen receptor (ER+) with macrophages through different soluble molecular mediators. The tumor-associated macrophages (TAMs) have the ability to influence different key aspects of neoplastic cells such as proliferation, migration, invasive capacity and survival.

Faced with ER+ breast tumors, it is very common in the clinic to use inhibitors of this receptor as adjuvant treatment. But in many cases, tumors that initially respond favorably to treatment with ER inhibitors become resistant. Based on the results obtained in this thesis, macrophages conditioned with TNF- $\alpha$ , when interacting with ER+ breast tumor cells, can cause resistance to endocrine treatments directed against ER. The interaction between ER+ breast cancer cells with macrophages produces the increase of several proinflammatory cytokines in the tumor micro-environment, which activate key signaling pathways in the breast epithelial cells that induce proliferation in a manner independent of the stimulation with 17 $\beta$ -estradiol. A large part of this mechanism is described, in which TNF- $\alpha$  and IL-6 play a fundamental role in activating the transcription factors NF- $\kappa$ B and STAT3. These two transcription factors together with ER $\alpha$  would form a new transcriptional complex capable of inducing proliferation through the expression of genes such as *cyclin D1* and *c-Myc*. For this to happen, ER $\alpha$  must be activated in an alternative, ligand-independent manner, and ERK-1 would be the kinase involved in this process.

On the other hand, the second chapter of this thesis is devoted to the study of the possible carcinogenic effects of oxalate on breast epithelial cells. It is believed that the main source of oxalate in breast tissue is of metabolic origin although very little is known about this process. The oxalate can be found in soluble form as a free ion or in solid form by forming very little soluble salts with divalent cations such as the calcium oxalate crystals that give rise to a large part of the micro-calcifications in the breast tissue.

It was found that free oxalate has the ability to induce proliferation in different breast epithelial cell lines. In addition, oxalate was also able to induce the expression of the *c-fos* proto-oncogene in MCF-7 cells, which is part of the known immediate early genes.

This was also observed at the protein level, MCF-7 cells expressed high levels of c-fos an hour and a half after being stimulated with oxalate.

The c-fos protein can induce proliferation by acting as an AP-1 transcription factor when heterodimerizing with Jun family proteins. This suggests that the free oxalate in solution has the ability to produce certain changes in the expression of some key genes involved in proliferation.

Finally, it was demonstrated in an in vivo model that the presence of free oxalate in the micro-environment of the breast of Nu / Nu mice has the capacity to produce highly aggressive and undifferentiated tumors with characteristics of a fibrosarcoma. The rate at which the tumors formed was directly proportional to the concentration of free oxalate in the breast tissue.

## Abreviaturas

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio

CaOx: Oxalato de calcio

CaP: Hidroxiapatita

CEC: Electro cromatografía capilar

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

DCIS: Carcinoma ductal in situ

E2: 17β-Estradiol o estradiol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERK-1: Quinasa regulada por señales extracelulares 1

ERα/β: Receptor de estradiol alfa/beta

FASL: Ligando de FAS (CD95)

FBS: Suero fetal bovino

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

H&E: Tinción de hematoxilina-eosina

h: Horas

HCl: Ácido clorhídrico

HRP: Peroxidasa de rabanito

ICI 182,780: Fulvestrant

IEG: Gen de expresión temprana

iNOS: Sintetasa de óxido nítrico inducible

IP: Inmunoprecipitación

kDa: Kilo dalton

LPS: Lipopolisacárido

mA: Mili-Ampere

mAb: Anticuerpo monoclonal

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL-2)

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1)

MF: Fracción microsomal

mL: mililitro

mM: Milimolar  
MMP: Metaloproteinasas de la matriz extracelular  
mRNA: ARN mensajero  
ng: Nanogramo  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
PBS: Buffer fosfato  
PMA: Forbol 12-miristrato 13-acetato  
PSN: Penicilina, Estreptomicina, Neomicina  
Rantes: CCL-5  
RelA: p65  
ROS: Especies de oxígeno reactivo  
RT-qPCR: PCR en tiempo real cuantitativa  
SDS: Dodecil sulfato de sodio  
SERMs: Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos  
SF: Fracción sobrenadante  
SI: Sistema inmune  
siRNAs: ARN pequeños de interferencia  
STAT3: Traductor de señal y activador de la transcripción 3  
TAMs: Macrófagos asociados a tumores  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta  
TH: Homogenato total  
TMB: Tetramethylbenzidine  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF  
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial  
 $\mu$ M: Micromolar

# **CAPÍTULO 1**

## **Efecto del micro-medioambiente tumoral modulado por macrófagos en cáncer de mama**



---

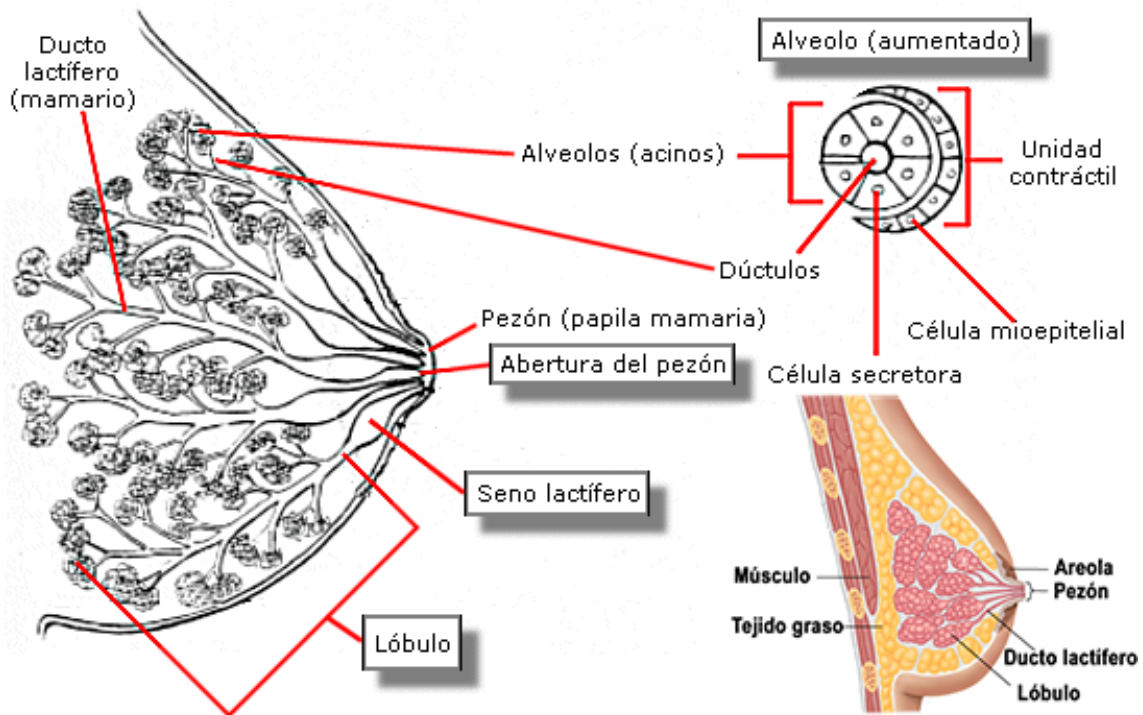
## Introducción

### Rasgos anatómicos de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias están presentes en ambos sexos. En el hombre se mantienen rudimentarias toda la vida, en cambio en la mujer están poco desarrolladas hasta antes de la pubertad, cuando empieza el proceso de maduración bajo el influjo de las hormonas femeninas (estradiol y progesterona). Desde el nacimiento hasta la edad adulta, las mamas sufren más cambios que ningún otro órgano. El máximo desarrollo de estas glándulas se produce durante el embarazo y especialmente en el período posterior al parto, durante la lactancia. En la menopausia, los niveles hormonales descienden y gran parte de la glándula mamaria se atrofia y es sustituida por grasa [1].

La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos, y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida [2].

Un conjunto de quince a veinte lóbulos mamarios conforman la glándula mamaria (Fig. 1). Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor, los conductos lactíferos. Los lobulillos están formados por diez a cien alvéolos (acinos), cada cual con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están tapizados en su interior por un conjunto de células secretoras que producen la leche y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción. A su vez están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche [1].



**Figura 1: Estructura de una glándula mamaria y de un alveolo**

Se muestra una vista lateral de la glándula mamaria donde se especifican las diferentes estructuras. En la parte externa se observa la areola y el pezón. En la parte interna se observan los lóbulos, alveolos, los ductos y senos lactíferos junto al tejido graso que rodea todas estas estructuras.

### **Cáncer de mama y el micro-medioambiente**

La glándula mamaria es un tejido complejo compuesto por un parénquima epitelial rodeado de una matriz de células estromales. Esta matriz incluye fibroblastos, miofibroblastos, adipocitos, macrófagos, otras células del sistema inmune, células endoteliales y componentes de la matriz extracelular (ECM). La intercomunicación entre las células epiteliales y las células del estroma es esencial para el normal desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria. El estroma normal fisiológico mantiene la polaridad de las células epiteliales e inhibe el crecimiento celular descontrolado [3].

Por mucho tiempo se ha considerado el origen del cáncer como un proceso celular autónomo, el cual es producto de la adquisición de sucesivas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que conllevan a un aumento en la capacidad proliferativa de las células y una mayor resistencia a la muerte [4]. Esto es una simplificación que no considera las interacciones que existen entre las células tumorales con los demás tipos de células que las rodean. Las células epiteliales que poseen mutaciones protumorales

emergentes tienen la capacidad de provocar muchos cambios en el estroma del tejido mamario, los cuales contribuyen en la iniciación y progresión del tumor [5, 6]. Estos cambios incluyen un aumento en el número de fibroblastos y de células linfocitarias infiltrantes [7, 8]. También se produce un incremento en la densidad capilar por la formación de nuevos vasos sanguíneos que contribuyen con la promoción del tumor y las metástasis. Se incrementa la cantidad de colágeno tipo 1 y de fibrina lo cual en forma colectiva altera la estructura y rigidez de la matriz extracelular [9-11]. Se ha descrito que las células del estroma en tumores de mama presentan un comportamiento alterado a raíz de modificaciones epigenéticas que derivan en cambios en el patrón de expresión de muchos genes claves con los cuales se puede predecir la evolución clínica de la enfermedad. Esto indica la importancia de la influencia del estroma tumoral en la progresión de la enfermedad [12, 13].

Las células del estroma interactúan con las células tumorales ya sea de forma directa célula-célula o vía factores paracrinós y endocrinos solubles. Este proceso de intercomunicación entre las células cancerosas y las células de su entorno es recíproco. Es decir que las células cancerosas son capaces de modular el comportamiento de las células estromales y aledañas, al mismo tiempo que estas últimas también pueden afectar el crecimiento y la evolución de las células tumorales. Este conjunto de interacciones complejas entre todos los tipos de células presentes en un tumor crea el denominado “micro-medioambiente tumoral” [14]. Ha sido demostrado que el micro-medioambiente tumoral contribuye activamente a la génesis y el desarrollo del tumor ya que estimula vías de señalización de supervivencia y antiapoptóticas al mismo tiempo que promueve el crecimiento descontrolado y las metástasis, un factor crítico de la enfermedad [15-20].

### **Aspectos generales sobre el rol del sistema inmune en tumores sólidos**

Los infiltrados de células leucocitarias en el tumor constituyen la principal población de células del estroma con capacidad de modificar el micro-medioambiente y por lo tanto son actores fundamentales en la evolución de la enfermedad. Los leucocitos son reclutados del torrente sanguíneo, si bien en fases tempranas la principal fuente de leucocitos proviene del tejido circundante [21, 22]. Idealmente es de esperar que el sistema inmune (SI) actúe destruyendo a las células cancerosas pero esto no siempre es lo que ocurre. Hoy se conoce que el SI tiene la capacidad de cumplir dos roles completamente antagónicos en el cáncer. Por un lado, el SI es capaz de suprimir el

crecimiento de un tumor, ya sea por inhibición de la proliferación de las células neoplásicas o por la lisis de las mismas, y por el otro puede promover su progresión [23, 24]. En este último caso el SI puede facilitar la selección de células del tumor capaces de sobrevivir a su acción efectora y también puede establecer en el tumor un micro-medioambiente inflamatorio crónico supresor que facilite la inmunoevasión y la progresión [25-27]. En este sentido se ha observado que el tipo y la cantidad de células leucocitarias infiltrantes contribuyen diferencialmente en la respuesta inmune del huésped ya sea atacando las células tumorales o favoreciendo su crecimiento.

Con respecto a las células de linaje linfoide, varias poblaciones diferentes de células T han sido observadas en el micro-medioambiente tumoral. Entre estas, se ha reportado que los linfocitos T cooperadores 1 (Th1, CD4<sup>+</sup>) y linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) se ubican como las principales células inmunitarias efectoras con actividad anti tumoral [28]. Dentro de los muchos factores secretados por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y Th1, ambos tipos de células se caracterizan por producir interferón gamma (INF $\gamma$ ), considerado uno de los factores de mayor significancia en la prevención y supresión del desarrollo tumoral. Sin embargo, no todas las células T ejercen una actividad anti tumoral clara. Los roles desempeñados por los linfocitos Th17, Th2 (CD4<sup>+</sup>) y T reguladores (CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>) en el desarrollo tumoral no son del todo claros, ya que han sido documentados resultados contradictorios en análisis clínicos y modelos animales [29, 30]. Los infiltrados de células B en el micro-medioambiente secretan citocinas protumorigénicas que favorecen la progresión de la enfermedad. Su importancia en este sentido se evidencia en los modelos de ratones deficientes en linfocitos B, los cuales exhiben resistencia a la formación de ciertos tumores singénicos [31, 32]. Células asesinas naturales (NK) y linfocitos NKT también forman parte del micro-medioambiente y su presencia se correlaciona con un mejor pronóstico en cáncer de mama [33-36].

Células supresoras de origen mieloide (MDSCs) y mastocitos han sido asociados con el crecimiento y la progresión tumoral debido a su capacidad de bloquear el montado de una respuesta inmune efectiva [37, 38]. Se ha demostrado en varios modelos animales que los infiltrados de MDSCs son capaces de promover la vascularización de los tumores e interrumpir el principal mecanismo de inmunovigilancia mediante la interferencia en la presentación de antígenos de las células dendríticas (DCs), así como en la activación de células T y bloqueando la citotoxicidad de las células NK. Por su parte, los mastocitos han sido asociados con la liberación de factores que potencian la proliferación de células endoteliales para promover la angiogénesis.

## Macrófagos asociados a tumores

Los macrófagos constituyen una de las poblaciones más abundantes en el micro-medioambiente tumoral. En el pasado se consideraba que la función de los macrófagos en un entorno tumoral era la de atacar y destruir a las células malignas [39]. Hoy se sabe que ésta, es sólo una de las posibles facetas de los macrófagos, la cual se corresponde con su activación clásica. A estos macrófagos con capacidad citotóxica se los conoce como macrófagos M1 [40, 41]. Hasta el momento se han reportado una gran cantidad de estudios sobre el pronóstico de diferentes tipos de tumores con infiltraciones de macrófagos o TAMs (*Tumor-associated Macrophages*). Paradójicamente, estos estudios mostraron que la mayoría de los tumores que presentan TAMs tienen pronósticos desfavorables, como ocurre en los casos de cáncer de útero, esófago, hígado, tiroides, vejiga y de mama [42, 43]. Mientras que sólo en algunos tipos de tumores los TAMs han sido asociados con pronósticos favorables como en cáncer colorrectal y de próstata [44].

Estas discrepancias en cuanto al efecto de los TAMs se deben en gran medida a que los macrófagos son células muy plásticas y versátiles capaces de expresar una gran cantidad de programas funcionales en respuesta a las diferentes señales del micro-medioambiente. Los macrófagos poseen un continuo de diferentes estados funcionales posibles en cuyos extremos opuestos se pueden ubicar a los ya mencionados macrófagos M1 y a los macrófagos M2 o alternativos [40]. Además, dichos estados no son permanentes como en el caso de una diferenciación celular, sino que se comportan de una manera mucho más plástica y pueden ser modificados por diferentes señales del entorno (Fig. 2 a). Los TAMs presentes en tumores humanos y murinos generalmente exhiben un fenotipo inclinado hacia el extremo M2 [45]. Los TAMs con perfil tipo M2 comparten varias características propias de los macrófagos M2, pero no todas, y están asociados a la promoción del tumor, la remodelación del tejido, angiogénesis y la supresión de la respuesta inmune adaptativa [46-48].

La población de TAMs en los tumores humanos se sostiene principalmente mediante la acción de las quimiocinas, las cuales cumplen un rol esencial en el reclutamiento de monocitos en los tejidos neoplásicos. MCP-1 (CCL-2) es la quimiocina más frecuentemente encontrada en los tumores sólidos incluyendo carcinomas de mama, útero y ovario y es la proteína quimioatrayente de monocitos por excelencia [49]. Sin embargo, en el micro-medioambiente tumoral se encuentra también una variedad de

otras quimiocinas como CXCL1 (Gro1), CCL5 (Rantes), CXCL8 (IL-8) por nombrar algunas. Se ha reportado que las citocinas IL-4 e IL-13 vuelven a los monocitos extremadamente sensibles a los quimioatrayentes de neutrófilos como son Gro1 e IL-8 [40].

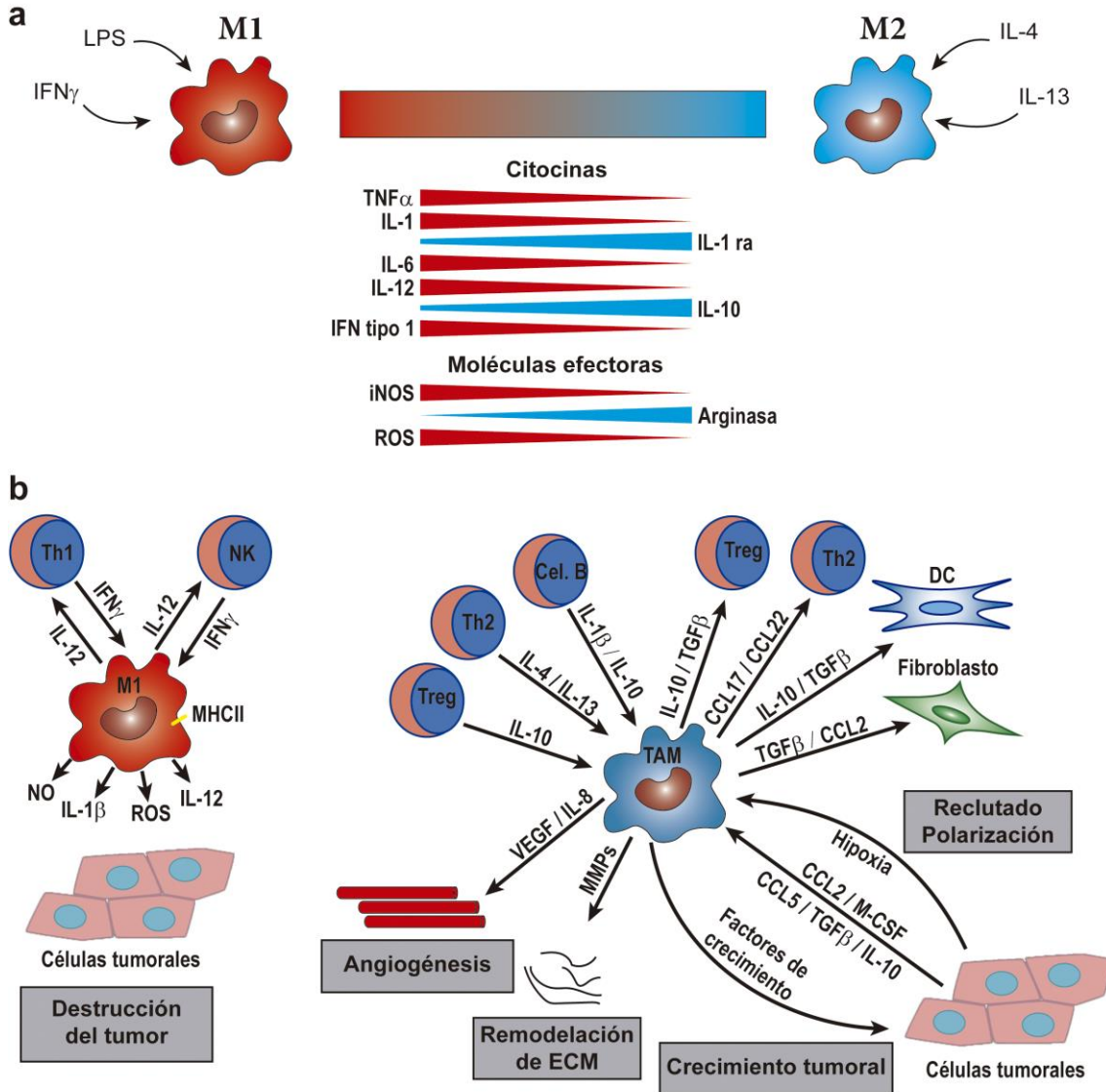


Figura adaptada de Mantovani A *et al*, Trends in immunology 2002 [40] y Galdiero MR *et al*, J. Cell. Physiol. 2013 [50].

**Figura 2: Diferentes estados de activación de los macrófagos y sus posibles efectos sobre células tumorales.**

a) Se muestran macrófagos M1 y M2 como los extremos opuestos de un continuo de diferentes estados de activación. En rojo y celeste se muestran las citocinas y moléculas efectoras características de los macrófagos M1 y M2 respectivamente.

b) En el panel derecho se muestra un típico TAM con una polarización tipo M2. Las células neoplásicas reclutan los macrófagos y favorecen la polarización de los mismos hacia un fenotipo protumoral. Factores liberados por células del sistema inmune como IL-4, IL-13 e IL-10 también contribuyen a una activación de los macrófagos tipo M2. A su vez los TAMs regulan muchos aspectos de la progresión tumoral como la proliferación, la remodelación de la ECM y angiogenesis. En el panel izquierdo se observa un macrófago M1 clásico y su

interacción con células Th1 y NK. El macrófago M1 libera moléculas efectoras (NO, ROS) y proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-12) que producen daño tisular y destruyen las células tumorales. A su vez los macrófagos M1 tienen una eficiente capacidad de presentación antigénica a través del MHCII. Abreviaturas: TNF: Factor de necrosis tumoral, IL: Interleucina, IFN: Interferón, iNOS: Sintetasa de óxido nítrico inducible, IL-1 ra: antagonista del receptor de IL-1, ROS: Especies de oxígeno reactivo, NO: Óxido nítrico, MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, MMPs: Metaloproteinasas de la ECM, ECM: Matriz extracelular, VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial, TGF: Factor de crecimiento transformante, M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

La polarización de los macrófagos en dos estados antagónicos de activación M1 y M2 es una simplificación que permite una mejor comprensión a la hora de estudiar el comportamiento de estas células. Agentes microbianos como lipopolisacáridos (LPS) o la citocina IFN- $\gamma$  promueven una polarización de los macrófagos hacia el extremo M1, los cuales se caracterizan por secretar altos niveles de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-12 y moléculas efectoras citotóxicas como la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y especies de oxígeno reactivo (ROS) [41].

Por el contrario, las citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 promueven una polarización de los macrófagos hacia el extremo M2. Los macrófagos M2 son capaces de estimular y favorecer el crecimiento tumoral mediante la expresión de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Estos macrófagos también secretan moléculas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), IL-8 y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) que estimulan la angiogénesis y la remodelación de tejido. A su vez, los macrófagos M2 también son capaces de suprimir el SI de manera local mediante la expresión de prostaglandina E2 e IL-10 [40, 51-54].

Esto indica que los macrófagos tienen el potencial de ejercer una doble función. Por un lado pueden atacar al tumor destruyendo a las células neoplásicas y por el otro pueden favorecer la formación de un micro-medioambiente propicio para el crecimiento y la progresión del tumor. El resultado final dependerá del estado funcional de los macrófagos y de las propiedades intrínsecas de las células tumorales [55, 56].

### **Implicancias de un ambiente proinflamatorio en el cáncer**

El hecho de que los macrófagos M1 tengan la capacidad de destruir células ajenas a nuestro organismo o alteradas, como las tumorales por ejemplo, podría sugerir que las citocinas proinflamatorias contribuyen en este mismo sentido. Por el contrario, las evidencias indican que es mucho más probable que un ambiente proinflamatorio contribuya con el crecimiento y progresión tumoral e inmunosupresión a que favorezca el montado de una respuesta antitumoral efectiva. Ya en el año 1863 Rudolf Virchow, al encontrar infiltrados leucocitarios en tejidos tumorales, relacionó la inflamación crónica con el cáncer. En general las inflamaciones crónicas y de bajo grado han sido asociadas con efectos pro-tumorales mientras que las inflamaciones agudas y de alto grado se relacionan con efectos anti-tumorales [57].

El micro-medioambiente tumoral, determinado por las células neoplásicas y los diferentes componentes del estroma (células del SI, tejido conectivo, etc.), contiene una red de citocinas que son comunes en muchos tumores sólidos. Dicha red generalmente carece de citocinas involucradas en establecer una respuesta inmune antitumoral efectiva y es rica en citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas [58]. Muchas de estas citocinas son inducidas por hipoxia, la cual es una de las principales diferencias fisiológicas entre el tejido sano y tumoral [59]. Ejemplos de tales citocinas son TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 y las quimiocinas MCP-1 (CCL-2), IL-8, y Rantes (CCL-5).

Una red de citocinas proinflamatorias puede tener influencia sobre la supervivencia, proliferación, estabilidad genómica, diferenciación y migración tanto de las células neoplásicas como de las células del estroma. Por ejemplo, citocinas proinflamatorias pueden inducir la producción de óxido nítrico (NO) el cual tiene efectos mutagénicos. Por otra parte se ha reportado que IL-6, IL-1 e IL-8 tienen un efecto mitogénico en diferentes tipos de cáncer como el mieloma múltiple, carcinoma gástrico y el melanoma, respectivamente [60-62].

Con respecto a la supervivencia de la célula tumoral, IL-6 y TNF- $\alpha$ , a través de los factores de transcripción STAT3 y NF-kB respectivamente, pueden estimular la expresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y c-FLIP [63, 64]. STAT3 y NF-kB también pueden interferir en las síntesis de la proteína p-53, la cual está implicada en varios mecanismos antitumorales [65].

La angiogénesis es otra característica propia de los tumores sólidos, la cual también



está dirigida por hipoxia. Además, citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 pueden estimular la producción de factores angiogénicos como VEGF. En muchos casos se ha asociado a los TAMs con la vascularización tumoral y peores pronósticos, incluso el TGF- $\beta$  producidos por los macrófagos tiene capacidad angiogénica [66].

Desde una perspectiva clínica, las metástasis son el aspecto más crítico de las enfermedades neoplásicas debido a que alrededor del 90 % de las muertes por cáncer es causada por las metástasis. Un micro-medioambiente inflamatorio puede promover las metástasis debido a que incrementa la permeabilidad vascular, lo cual facilita la intravasación de las células tumorales al torrente sanguíneo. A su vez, TNF- $\alpha$  e IL-6 pueden promover la supervivencia de las células tumorales circulantes [67].

### **TNF- $\alpha$ e IL-6 en el micro-medioambiente tumoral**

TNF- $\alpha$  e IL-6 son tal vez unas de las citocinas protumorigénicas más estudiadas debido a su habilidad para activar factores de transcripción oncogénicos como NF- $\kappa$ B, AP-1 (TNF) y STAT3 (IL-6) en células epiteliales [68, 69]. Como ya se dijo TNF- $\alpha$  e IL-6 tienen influencia sobre todos los estadios del desarrollo tumoral incluyendo la iniciación, la promoción y la metástasis [70, 71]. Más del 50 % de todos los tipos de cáncer presentan una activación aberrante de NF- $\kappa$ B y/o STAT3 lo cual incrementa el crecimiento tumoral debido a que induce resistencia a la apoptosis y una mayor velocidad de proliferación [72].

TNF- $\alpha$  es una proteína de 17 kDa que forma un homotrímero en solución, no unido covalentemente. El TNF- $\alpha$  se sintetiza como una proteína transmembrana de 26 kDa que es convertida en su forma soluble antes mencionada mediante el clivaje de una enzima llamada TACE (*TNF-converting enzyme*) [73]. Hay dos tipos de receptores de TNF- $\alpha$ : el TNFR1, el cual se encuentra expresado en la mayoría de las células del cuerpo, y el TNFR2, el cual se expresa principalmente en células hematopoyéticas. El TNFR1 es activado por el TNF- $\alpha$  soluble mientras que el TNFR2 se une principalmente al TNF- $\alpha$  transmembrana. Los receptores de TNF- $\alpha$  también se encuentran en forma soluble en el organismo, ésta es una forma de inhibir la bioactividad de TNF- $\alpha$  ya que los receptores solubles compiten con los receptores en la superficie de las células por la unión al ligando [74].

En un comienzo se pensó que el TNF- $\alpha$  tenía la capacidad de ser intrínsecamente citotóxico para las células tumorales en modelos animales e incluso en humanos [75]. Sin embargo, luego se pudo comprobar que la mayoría de las acciones citotóxicas del

TNF- $\alpha$  se producen en combinación con otros componentes como inhibidores metabólicos o IFN $\gamma$  [76, 77]. Sólo, el TNF- $\alpha$  es incluso capaz de inducir inflamación y supervivencia [78]. De hecho muchas células malignas producen de manera constitutiva pequeñas cantidades de TNF- $\alpha$  [79]. Es decir que la activación del TNFR1 puede producir apoptosis por un lado o supervivencia e inflamación por el otro, el resultado final dependerá del contexto celular. Pero la vía de señalización por defecto de TNFR1 es la de inducir supervivencia e inflamación. La apoptosis es una respuesta tardía al TNF- $\alpha$  condicionada por otros factores. Sin embargo, otros miembros de la familia de proteínas TNF como FASL y TRAIL sí pueden inducir una respuesta rápida de apoptosis.

Esto significa que TNF- $\alpha$  puede estar involucrado tanto en la destrucción de tejido como en su remodelación, realizando contribuciones claves para el crecimiento e invasión tumoral. Por ejemplo, mientras el TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la muerte de células alteradas en el sitio de inflamación, también puede estimular el crecimiento de fibroblastos. Altas concentraciones locales de TNF- $\alpha$  en los tumores destruyen selectivamente los vasos sanguíneos, pero cuando esta citocina se produce de manera crónica en dosis bajas puede actuar como un promotor tumoral endógeno. El TNF- $\alpha$  es capaz de destruir vasos sanguíneos pero también de inducir factores angiogénicos [80]. En este sentido se ha reportado que en cáncer de mama el TNF- $\alpha$  puede regular la actividad de la enzima timidina fosforilasa la cual está involucrada en angiogénesis [81].

Si bien el TNF- $\alpha$  es una citocina pleiotrópica producida por muchos tipos celulares diferentes, las células de linaje monocítico como los macrófagos conforman la principal fuente de síntesis de TNF- $\alpha$  en el cuerpo humano. A su vez, TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de la quimiocina MCP-1 implicada en la atracción de monocitos y linfocitos estableciendo una conexión entre la inflamación y los infiltrados leucocitarios. El TNF- $\alpha$  es un “regulador maestro” de la producción de citocinas proinflamatorias y un actor central en la activación celular de vías inflamatorias a través de NF- $\kappa$ B y ERKs [82] (Fig. 3).

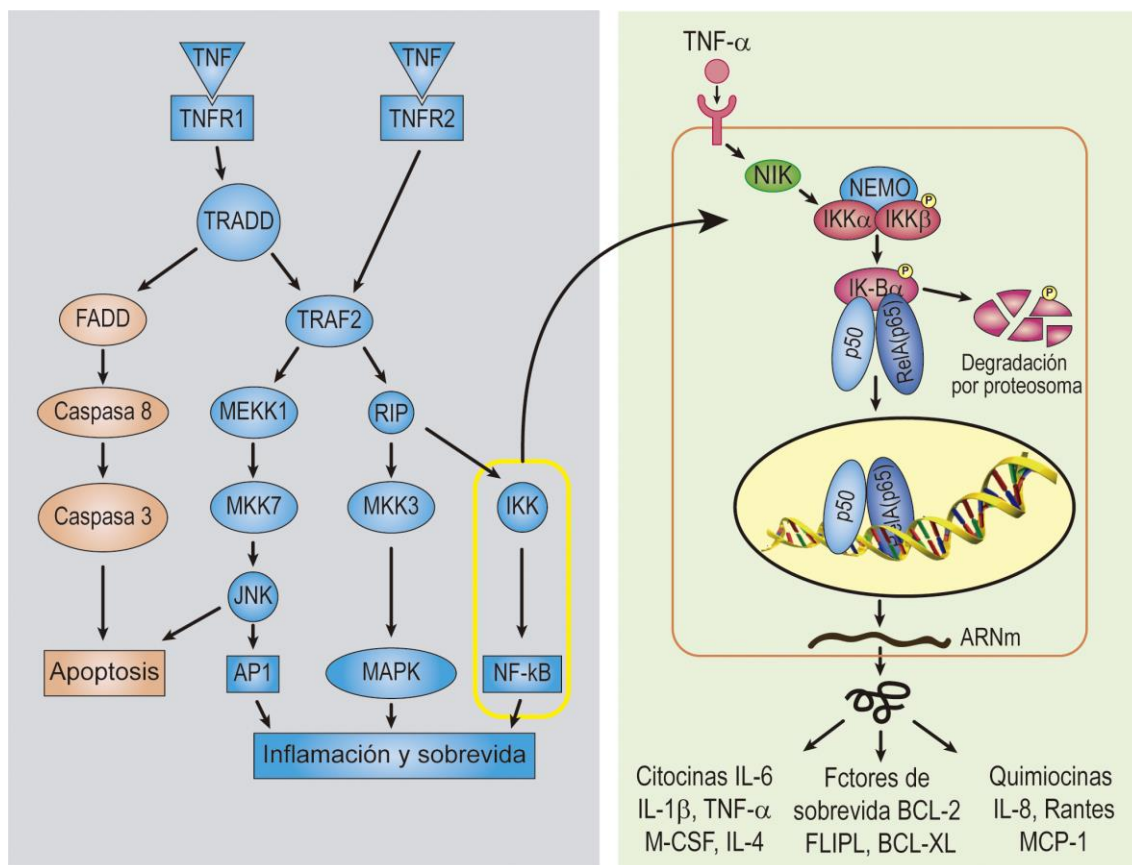


Figura adaptada de Balkwill F, Nat. Rev. Cancer 2009 [83].

### Figura 3: Vías de señalización de TNF-α.

La activación de los receptores de TNF-α (TNFR1/2) induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares que activan múltiples vías de transducción de señales (Panel izquierdo). En naranja se esquematiza la vía de señalización que conduce a la apoptosis. La activación de esta vía depende de otros estímulos externos. La activación de FADD (dominio de muerte asociado a Fas) vía TRADD (dominio de muerte asociado a TNFR) activa la caspasa 8 lo cual inicia una cascada de activación de proteasas regulada por otras caspasas (caspasa 3 y 9) y a la activación de vías mitocondriales que conducen a la muerte de la célula. La acumulación de ROS y la activación sostenida de JNK (quinasa amino terminal de Jun) también puede conducir a la apoptosis. En azul se muestran las diferentes vías de señalización que finalmente producen inflamación y supervivencia de las células. La activación de TRAF2 (factor 2 asociado a TNFR) es capaz de inhibir la apoptosis mediante la activación de cIAP (proteína citoplasmática inhibidora de apoptosis). TRAF2 inicia una cascada de fosforilación de quinasas que culmina en la activación del factor de transcripción AP-1 (cFos / cJun). TRAF2 también activa RIP (Proteína interactuante del receptor) el cual es capaz de activar diferentes cascadas de MAPKs (Proteína quinasa activada por mitógenos). El principal evento de señalización de RIP es la activación de la vía de NF-κB (marca amarilla y panel derecho). RIP activa NIK (quinasa inductora de NF-κB) y este a su vez activa a IKK (quinasas de IκB) la cual fosforila al inhibidor de NF-κB (IκB-β) el cual es degradado por proteosoma. NF-κB es capaz de inducir la transcripción de varias proteínas proinflamatorias, quimiocinas y factores de supervivencia.

Las oncoproteínas miembro de la familia de NF-κB regulan la transcripción de genes involucrados precisamente en la mayoría de los aspectos claves que fueran mencionados para la progresión tumoral como son la angiogénesis, remodelación de tejido,

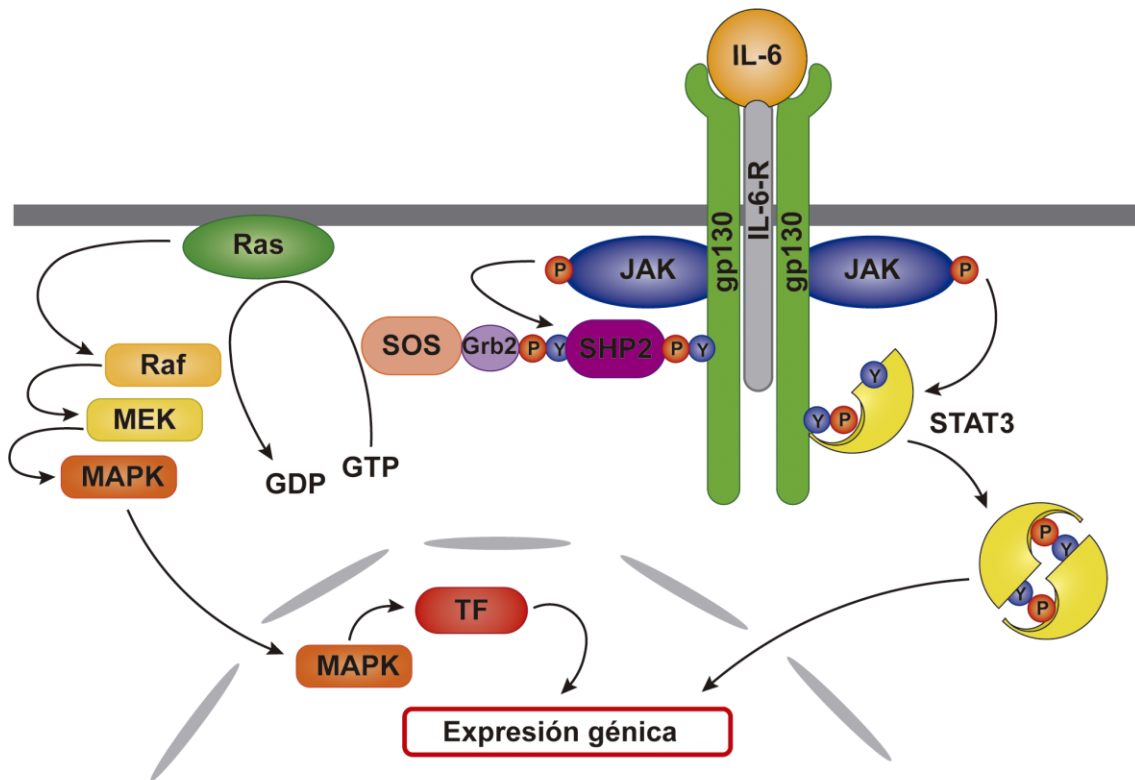
supervivencia celular y respuesta inflamatoria. Las principales citocinas y quimiocinas reguladas por NF- $\kappa$ B son IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 (CCL-2) y Rantes (CCL-5) [63, 84]. Esta combinación de citocinas y quimiocinas es capaz de influir de forma marcada en el micro-medioambiente y de contribuir a mantener el estado funcional o de activación que adoptan los TAMs hacia un fenotipo M2.

Por otra parte, la IL-6 es una glucoproteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su expresión está inducida por IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- $\alpha$ . IL-6 cumple un rol fundamental promoviendo la inflamación y la respuesta inmune [85, 86]. Originalmente identificada como un factor de crecimiento de células B, IL-6 ha mostrado tener la capacidad de inducir importantes señales de proliferación y supervivencia en varios tipos de leucocitos y de participar en el armado de la respuesta inmune [87, 88].

Se ha descripto una faceta anti inflamatoria para IL-6 actuando como miocina (citocina secretada por el tejido muscular). Aunque se ha demostrado que la vía de señalización de IL-6 en macrófagos, la cual depende del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, difiere de la vía de producción de IL-6 en los músculos, siendo en este último caso independiente de NF- $\kappa$ B [89]. Por esto, la expresión de IL-6 en monocitos o macrófagos siempre produce una respuesta proinflamatoria mientras que en el tejido muscular puede tener un efecto anti inflamatorio.

Altos niveles de IL-6 en el suero de pacientes con cáncer demostró ser un indicador pronóstico de peores resultados en la evolución de la enfermedad. Esto se observó en diferentes patologías neoplásicas como cáncer de mama, colon, gástrico, de pulmón y en melanoma [90, 91]. La principal fuente de IL-6 en el micro-medioambiente tumoral incluye a las mismas células neoplásicas así como los TAMs, MDSC, células T CD4<sup>+</sup> y fibroblastos [92, 93].

La activación de la vía de señalización de IL-6 en las células tumorales activa el factor de transcripción STAT3 (Fig. 4). La desregulación en la activación de STAT3 es considerado un evento oncogénico [69, 84, 88]. La activación de STAT3 puede provocar la progresión del cáncer a través de la transcripción de genes claves como el regulador del ciclo celular *ciclina D1*, el proto-oncogen *c-Myc* y reguladores transcripcionales como Jun-B y c-Fos [69, 84, 88]. Actuando a través de STAT3, IL-6 puede aumentar la capacidad de supervivencia de las células tumorales induciendo la expresión de las proteínas anti apoptóticas BCL-2, BCL-XL y survivin [94].



↑ Proliferación celular, supervivencia y metástasis

↑ Liberación de factores angiogénicos (VEGF)

↑ Inmunosupresión a través de MDSC, TAMs y DC tolerogénicas

Imagen adaptada de Heinrich PC. *et al*, Biochem J. 2003 [95].

#### Figura 4: Principales vías de señalización de IL-6

La citocina IL-6 se une a su receptor (IL-6-R) el cual se acompleja con un homodímero del transductor de señales gp130 (glicoproteína 130). Esto produce la activación de los miembros de la familia de tirosina quinasas JAK (*Janus Kinase*) JAK1, JAK2 y TYK2. Las tirosinas JAK fosforilan a gp130 en múltiples sitios, lo cual conduce al reclutamiento de la familia de proteínas STATs y su posterior fosforilación. STAT3 es el principal factor de transcripción activado por esta vía dependiente de IL-6. Posterior a su activación STAT3 dimeriza y trasloca al núcleo celular para actuar como factor de transcripción de sus genes blanco. A su vez JAK es capaz de fosforilar a SHP2, el cual a través del complejo SOS-Grb2 activa Ras y la subsecuente activación de la cascada de MAPKs (Proteínas quinasas activadas por mitógenos). SOS-Grb2: *Son of Sevenless-Growth factor receptor-bound protein 2*. TF: *Transcription Factor*.

Además, la activación de la vía de IL-6/STAT3 en las células tumorales puede favorecer la capacidad invasiva de las mismas, la transición epitelio mesenquimal, la angiogénesis y las metástasis a través de la expresión de MMPs, VEGF y FGF [96-99].

Sumado a la actividad intrínseca de IL-6 sobre las células tumorales, existe un efecto de dicha citocina actuando sobre diferentes componentes del estroma tumoral como las células endoteliales, TAMs y MDSCs [100]. En tumores de mama de modelos murinos,

altas concentraciones de IL-6 se correlaciona con la acumulación de MDSCs, las cuales tienen la capacidad de suprimir el montado de una respuesta inmune antitumoral [101, 102]. En esta misma línea, la activación de la vía de señalización IL-6/STAT3 impide la maduración y diferenciación de las DCs, de esta manera se impide la activación de las células T [103].

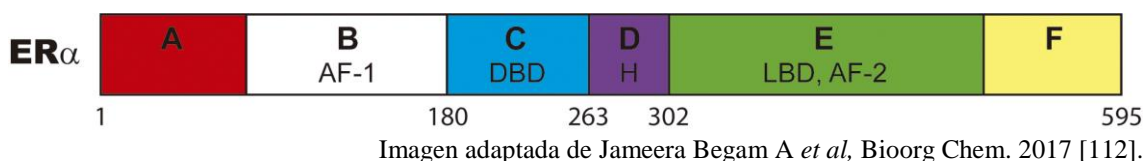
STAT3 es un importante mediador de las interacciones que ocurren entre los TAMs y las células tumorales. La activación de STAT3 juega un papel importante en la adquisición de un estado pro-tumoral tipo M2 de los macrófagos dado que muchos factores angiogénicos e inmunosupresores son regulados por dicho factor de transcripción [64, 104].

### **Receptores estrogénicos**

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroideas las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como el hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro. En las mujeres hay tres tipos de estrógenos naturales, la estrona (E1), el estriol (E3) y el estradiol (17 $\beta$ -estradiol o E2), siendo el E2 el estrógeno predominante en la circulación durante los años reproductivos de la mujer y el que presenta una mayor actividad estrogénica. La acción del E2 está mediada a través de su unión a dos tipos de receptores estrogénicos (ER) denominados ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de tipo I, también conocidos como receptores esteroideos [105, 106]. Se ha observado que el patrón de expresión de estos dos receptores es diferencial y varía según el tipo de tejido. Particularmente, en el tejido epitelial de mama se expresa mayoritariamente el ER $\alpha$  el cual es necesario para el desarrollo post-natal de la glándula mamaria [107, 108]. En general los efectos del ER $\alpha$  están relacionados con procesos proliferativos, mientras que los de ER $\beta$  se relacionan con procesos antiproliferativos y de diferenciación [109, 110]. Algunas células tumorales de mama expresan el ER $\beta$  pero la mayoría lo hace en niveles bajos o indetectables [111].

Los receptores de estrógenos poseen seis dominios estructurales denominados A, B, C, D, E y F (Fig. 5). El sitio N-terminal de los dominios A/B contiene el sitio AF-1 el cual contribuye en la actividad transcripcional y es un dominio esencial en la

interacción con los correguladores. El dominio C contiene el sitio de unión al ADN (DBD). El dominio D es una región bisagra que contiene secuencias que estimulan la localización nuclear. Finalmente, los dominios E/F localizada en la región C-terminal contiene un sitio de unión a ligando (LBD). El LBD también contiene una superficie de dimerización y un sitio de activación dependiente de ligando denominado AF-2. AF-1 y AF-2 controlan la actividad regulatoria transcripcional del ER $\alpha$ .



### Figura 5: Organización de dominios del ER $\alpha$

El ER $\alpha$  consiste de 6 dominios estructurales (A, B; C, D, E, F) que contienen diferentes sitios funcionales: AF-1 (*Activation Function-1*); DBD (*DNA-Binding Domain*); H (*Hinge*); LBD (*Ligand Binding Domain*); AF-2 (*Activation Function-2*) y el dominio F.

La teoría clásica de las hormonas esteroideas establece que los ERs son activados por la unión al ligando E2 en el núcleo (Activación directa) [113]. La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional que causa la disociación con la chaperona HSP90. Luego el complejo ligando receptor homodimeriza y se une a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) presentes en los promotores de los genes diana, actuando como un factor de transcripción. Existe también un mecanismo de activación indirecto el cual incluye la interacción proteína-proteína con otro factor de transcripción. Es decir que en este caso el dímero del complejo ligando-ER regula la transcripción génica uniéndose a otra proteína y no al ADN. Por otro lado los ERs tienen un mecanismo de activación independiente de ligando, en el que varias proteínas quinasas implicadas en la vía de señalización de factores de crecimiento fosforilan el ER activándolo, pudiendo explicar este mecanismo el crecimiento independiente de hormonas [114] (Fig. 6).

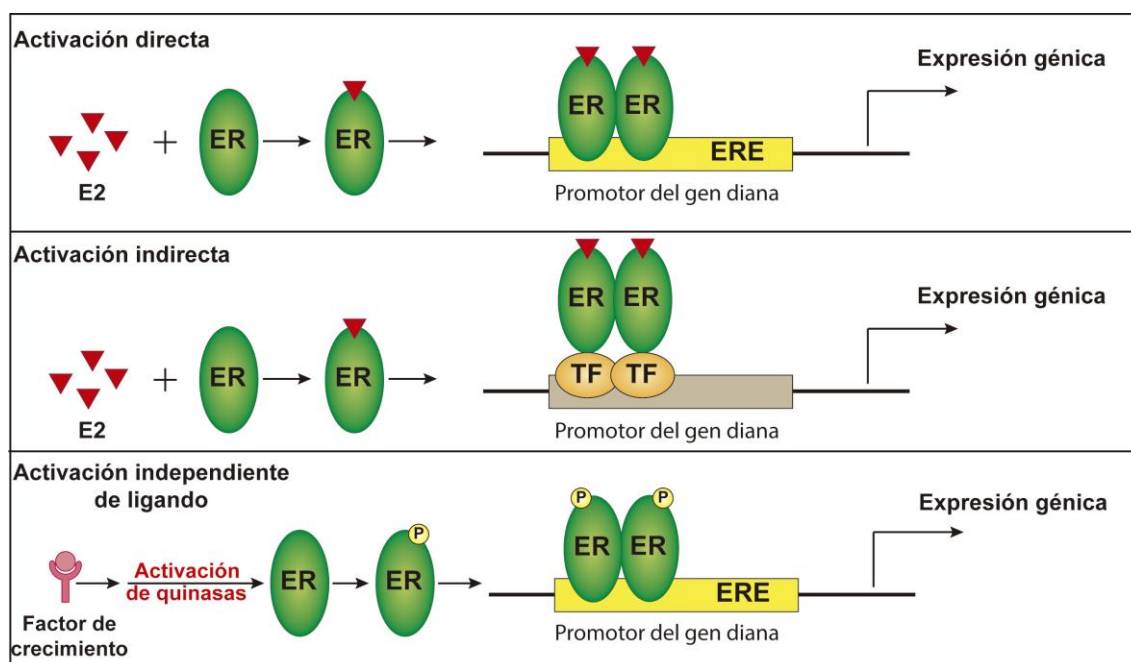


Imagen adaptada de Jameera Begam A *et al*, Bioorg Chem. 2017 [112]

**Figura 6: Mecanismos de acción del ERα**

E2: 17β-estradiol, ER: ERα en el citoplasma, ERE: elemento de respuesta a estradiol, TF: factor de transcripción.

### Correguladores transcripcionales

Los correguladores son moléculas que mediante su interacción con distintos factores de transcripción pueden activar o reprimir la expresión de un determinado gen [115]. El número de correguladores es enorme, sugiriendo que para que una activación o represión sea eficiente se necesita una combinación específica de eventos que incluye a los correguladores, factor de transcripción y promotor involucrado además del tipo celular y su contexto.

Distintas modificaciones post-traduccionales (fosforilación, metilación, acetilación, etc.) tanto en los factores de transcripción como en sus correguladores aumentan o disminuyen la afinidad entre ambos componentes alterando indirectamente la expresión de un determinado gen [116].

Los coactivadores aumentan la capacidad transcripcional a través de una combinación de mecanismos que incluyen un reclutamiento más eficiente de la maquinaria basal de transcripción, mediante actividades enzimáticas propias o de otras proteínas que se asocian a ellos. Estas actividades enzimáticas en general producen una remodelación en la cromatina debido a fosforilación (SWI-SNF), acetilación (CBP/p300, pCAF, SRCs), metilaciones (CARM1, PRMT-1/2) y ubiquitinaciones (E6-



AP, Rsp5). La asociación de los factores de transcripción y de los coactivadores a un determinado promotor se encuentra temporalmente regulada [117].

Los correpresores son reguladores negativos de la transcripción génica. SMRT y NCoR son dos correpresores que han sido asociados con ER $\alpha$ . Aunque estas dos moléculas parecen no poseer una actividad represiva intrínseca, tienen la capacidad de reclutar complejos que incluyen histonas deacetilasas que aumentan la compactación de la cromatina y limita la capacidad transcripcional. NCoR y SMRT interaccionan con ER $\alpha$  de manera independiente de ligando, pero en el caso SMRT no afecta la actividad mediada por estradiol.

### **Cáncer de mama ER+ y el tratamiento endocrino**

Alrededor de un 50-60 % de todos los tumores de mama primarios son positivos para el ER $\alpha$  [118]. La primera línea de tratamiento que se emplea en más de dos tercios de todos los tumores de mama ER+ es la terapia adyuvante anti estrogénica la cual logra reducir la mortalidad de los primeros quince años en un tercio [119, 120]. Esta terapia se basa en la utilización de diferentes drogas capaces de bloquear al receptor de estradiol. Por ejemplo, existen diferentes compuestos químicos llamados moduladores selectivos de ER (SERMs) que al unirse al receptor pueden actuar como agonistas o antagonistas dependiendo del órgano blanco.

El tamoxifeno es uno de los SERMs más conocidos por su acción antagonista en el tejido mamario al bloquear el dominio AF-2 del ER $\alpha$  y se lo utiliza ampliamente en mujeres pre y post menopáusicas. También existen otros compuestos tales como el fulvestrant (ICI 182,780) y ICI 164,384 que son antagonistas puros ya que bloquean la actividad del ER en todos los tipos de tejidos evitando el reclutamiento de coactivadores de la transcripción y promoviendo la interacción con correpresores [121].

Otra de las estrategias utilizadas en el tratamiento de tumores de mama ER+ es el uso de inhibidores de aromatasas, los cuales directamente bloquean la producción de estradiol. Esta última alternativa si bien demostró ser efectiva en muchos casos sólo puede ser utilizada en mujeres post menopáusicas.

Los tratamientos que se basan en bloquear el estímulo mitogénico dependiente de ER son prometedores y en muchos casos han dado buenos resultados. Sin embargo, tal estrategia terapéutica necesita ser mejorada debido a que se han identificado varios mecanismos de resistencia a los tratamientos endocrinos en cáncer de mama.

Una hipótesis que se ha desarrollado a partir de modelos de laboratorio es que la fosforilación independiente de ligando del ER $\alpha$  podría causar resistencia a tamoxifeno [122-125]. Un sitio de fosforilación muy estudiado es el de la serina (S) 118 en el dominio AF-1. Tanto el estradiol como factores de crecimiento (EGF, FGF, etc.) estimulan la fosforilación en la S118. Los factores de crecimiento, a través de sus receptores activan la vía de señalización de MAPK (ERK 1/2) las cuales pueden fosforilar la S118 de una manera independiente de ligando.

Existen además otros mecanismos de resistencia al tratamiento endocrino que involucra la modificación en los niveles de correguladores transcripcionales [126]. Por ejemplo se ha descrito que los niveles de NCoR se incrementan tras el tratamiento con tamoxifeno y tumores resistentes a tamoxifeno mostraron bajos niveles de NCoR [127]. También se ha reportado que los coactivadores miembros de la familia SRC tienen la capacidad de modular la proliferación basal mediada por estrógenos en células resistentes a tamoxifeno [128]. Además SRC1 ha sido asociado con la promoción de metástasis y resistencia a inhibidores de aromatasas en cáncer de mama [129].

La sobre-expresión de proteínas reguladoras claves en proliferación y supervivencia como NF-kB [130], c-Myc, ciclina D1 [131, 132] y STAT3 [131] también han sido asociadas con resistencia a tratamientos endocrinos.

Se ha reportado una interacción entre el ER $\alpha$  y el NF-kB donde el ER $\alpha$  activado por E2 en principio tendría un efecto supresor en genes de células de mama que responden a NF-kB [133]. De hecho, los tumores de mama ER- son asociados con elevada actividad de NF-kB [134, 135] y con un incremento en la expresión de las citocinas IL-6, IL-8 y las quimiocinas Rantes (CCL-5) y MCP-1 (CCL2) [136, 137]. En el mismo sentido, los inhibidores de aromatasas son capaces de remover el efecto supresor del E2 sobre NF-kB. Sin embargo, esta inhibición de NF-kB por ER $\alpha$  estaría siendo modulada por el coactivador CBP, el cual tendría la capacidad de revertir el antagonismo observado entre ambos factores de transcripción [133, 138]. Las evidencias indican que no existiría un único mecanismo de transrepresión de NF-kB por el ER $\alpha$  activado y que éste dependería de la combinación de distintos factores, el contexto y el tipo celular.

## Objetivo general

Este primer capítulo se centra en el estudio de la interacción entre los TAMs con las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos (células ER+) y el impacto que esto tiene sobre dichas células tumorales. La hipótesis de trabajo es que alteraciones en los TAMs podrían producir modificaciones del micro-medioambiente tumoral que favorezcan la resistencia de los tumores de mama ER+ a los tratamientos endocrinos. El objetivo final de esta tesis es dilucidar el mecanismo por el cual los TAMs, que forman parte del micro-medioambiente tumoral, favorecen el desarrollo de resistencia a los tratamientos hormonales (SERMs y antagonistas del ER $\alpha$ ) en las células tumorales de mama.

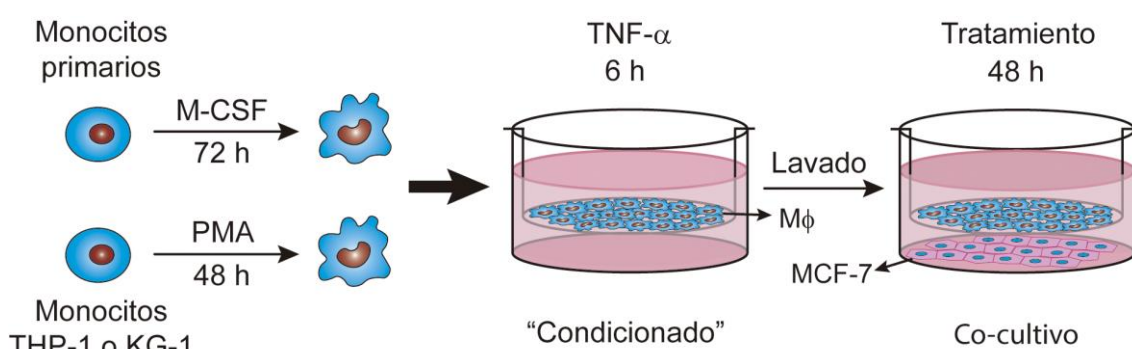
## Objetivos específicos

1. Determinar mediante ensayos *in vitro* posibles efectos en la proliferación de células de cáncer de mama humanas ER $\alpha$  + o ER $\alpha$  - causados por la presencia de macrófagos.
2. Estudiar en un modelo de cáncer de mama ER $\alpha$  + probables cambios en la capacidad invasiva y migratoria inducidos por la presencia de macrófagos.
3. Establecer si la presencia de macrófagos induce o favorece el desarrollo de resistencia, por parte de las células de cáncer de mama, a los tratamientos con drogas antagonistas del ER.
4. Estudiar en un modelo *in vivo* si el micro-medioambiente formado por macrófagos y monocitos favorece el desarrollo de resistencia endócrina de tumores de mama ER+ al tratamiento con drogas antagonistas de dicho receptor ampliamente utilizadas actualmente en la clínica como el tamoxifeno y el fulvestrant.
5. En caso de demostrarse que los macrófagos inducen resistencia a los antagonistas del ER en células tumorales de mama (punto 3), establecer el mecanismo molecular por el cual los macrófagos inducen resistencia endócrina en las células de cáncer de mama y tratar de bloquear el desarrollo de dicha resistencia.

## Resultados

### Macrófagos condicionados promueven la proliferación de células de cáncer de mama ER $\alpha$ + de una manera independiente de estradiol.

En un principio se planteó evaluar cómo afectan los macrófagos el nivel de proliferación de células tumorales de mama ER+, las cuales normalmente responden al tratamiento endocrino con tamoxifeno. Para ello células de mama MCF-7 fueron co-cultivadas con macrófagos en un pocillo de inserción para separar ambas líneas celulares. El pocillo de inserción, donde se colocaron los macrófagos, posee una membrana semipermeable con un tamaño de poro de 0,4  $\mu$ m que permite la libre circulación de citocinas y demás solutos, pero impide el pasaje de una célula de un lado al otro evitando así el contacto directo entre ambos tipos de células. Es importante aclarar que previo al experimento de proliferación de las células MCF-7, los macrófagos fueron tratados con TNF- $\alpha$  a una concentración 1 ng/mL por 6 horas y luego lavados. A los macrófagos que fueron sometidos a este proceso los llamamos “macrófagos condicionados”, para más detalle se muestra un esquema del experimento (Fig. 7).

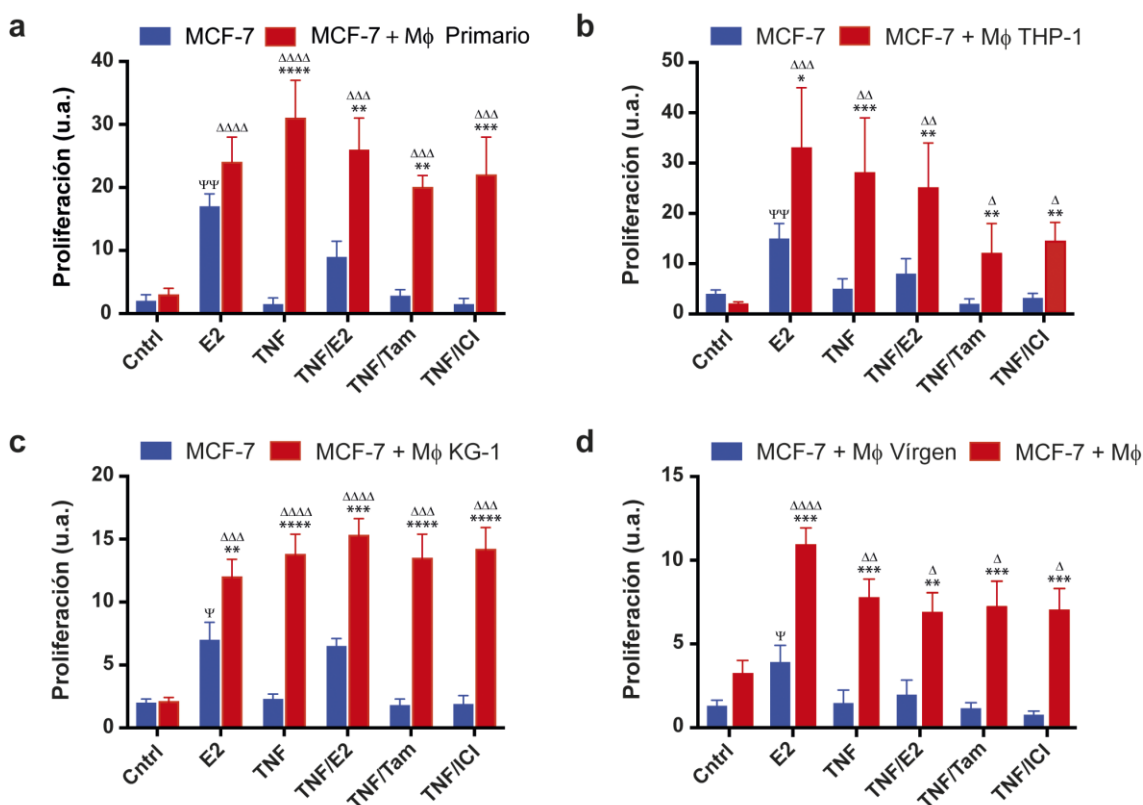


**Figura 7: Esquema experimental del co-cultivo de macrófagos condicionados con células MCF-7.**

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, PMA: Forbol 12-miristrato 13-acetato.

Estos ensayos, donde se evaluó la proliferación de las células MCF-7, se hicieron en presencia de macrófagos primarios humanos (diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica) o de macrófagos diferenciados a partir de las líneas monocíticas humanas THP-1 o KG-1 (Fig. 8a, 8b y 8c respectivamente). Las células MCF-7 utilizadas mostraron un comportamiento normal en respuesta a E2. Células MCF-7 cultivadas solas (sin macrófagos) proliferaron al ser estimuladas con E2 ( $P \leq 0.05$ ). También se observó que las células MCF-7 solas no proliferan al ser estimuladas con

TNF- $\alpha$  (Fig. 8 barras azules). Por otro lado, cuando las células MCF-7 son estimuladas con estradiol en presencia de macrófagos condicionados THP-1 y KG-1 muestran un aumento en la proliferación con respecto a las células MCF-7 solas ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente). Dicho incremento no fue significativo para las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos primarios. Pero lo más llamativo de todo fue que las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados KG-1, THP-1 o primarios proliferaron ante el estímulo con TNF- $\alpha$  en ausencia de estradiol ( $P \leq 0,0001$ ;  $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,0001$  respectivamente), incluso el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue suficiente para bloquear la proliferación de las células MCF-7 en estas condiciones ( $P \leq 0,05$  en todos los casos) (Fig. 8 barras rojas).



**Figura 8: Macrófagos condicionados inducen mayor proliferación y resistencia endócrina en células MCF-7**

Proliferación de células MCF-7 en presencia o ausencia de macrófagos primarios humanos (**a**), macrófagos de la línea celular THP-1 (**b**) o KG-1 (**c**) todos previamente condicionados con TNF- $\alpha$ . En (**d**) se muestra la proliferación de células MCF-7 con macrófagos KG-1 vírgenes o condicionados con TNF- $\alpha$ . Las células fueron cultivadas separadas por una membrana semipermeable y tratadas con los compuestos indicados por 48 h. La proliferación se midió por un método colorimétrico que tiñe el ADN (CyQuant) y se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM) expresado en unidades arbitrarias (u.a.). **Cntrl**: Medio DMEM sin factores adicionales, **E2**: Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF**: TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam**: Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI**: ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su control (Cntrl, del mismo color) ( $\Delta$  y  $\Psi$ ) o con

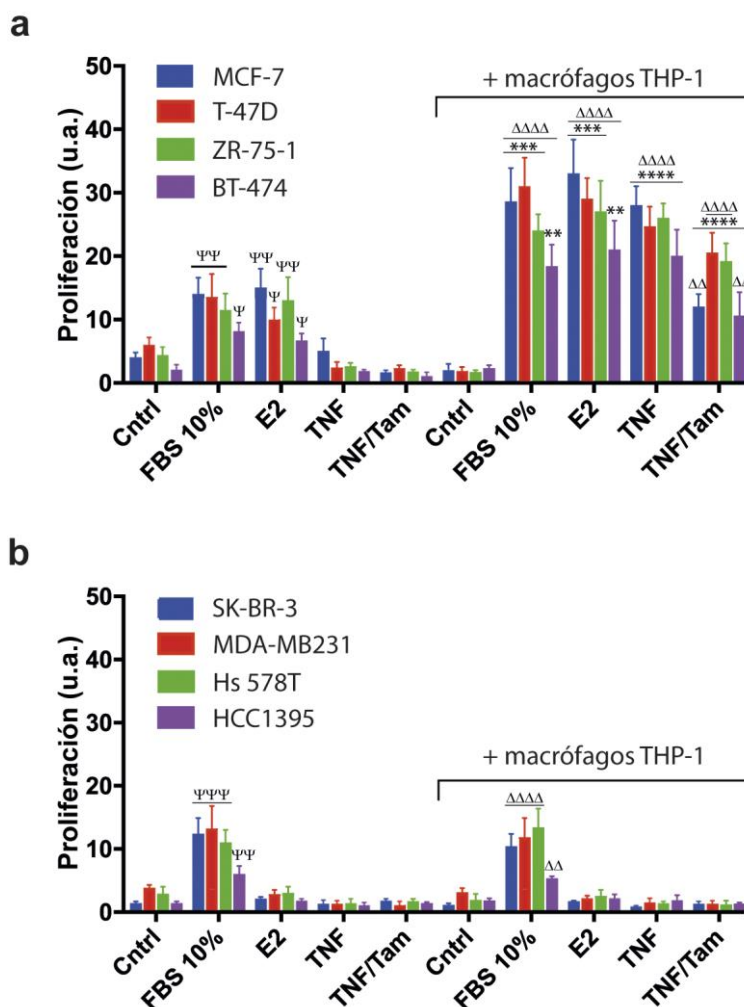
respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

Como se puede observar, los resultados obtenidos con los tres tipos de macrófagos utilizados fueron muy similares. En todos los casos el mero estímulo con TNF- $\alpha$  fue suficiente para inducir proliferación en las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados a tasas equiparables al de las células MCF-7 solas estimuladas con estradiol. Por el contrario las células MCF-7 solas no proliferaron al ser estimuladas con TNF- $\alpha$ . Estos experimentos nos permiten afirmar con claridad que los macrófagos condicionados tienen la capacidad de inducir resistencia a dos inhibidores diferentes del receptor de estrógenos. Por último, los macrófagos vírgenes (*naive*) que no fueron condicionados con TNF- $\alpha$  no fueron capaces de producir los mismos efectos que los macrófagos condicionados (Fig. 8d). Como ya se dijo el TNF- $\alpha$  es capaz de influir en el estado de activación de los macrófagos y de regular la expresión de diversas citocinas y quimiocinas que podrían estar involucradas en este fenómeno.

Algunas de las preguntas que surgen según lo descrito hasta el momento son: “¿La inducción de proliferación producida por TNF- $\alpha$  en los co-cultivos de células MCF-7 y macrófagos ocurre en otras líneas celulares de mama?” y “¿Este fenómeno es dependiente del ER $\alpha$  o de alguna otra vía totalmente diferente?”. Con el objetivo de comenzar a responder estas preguntas se hicieron experimentos de proliferación como el ya descrito para las células MCF-7, pero utilizando otras líneas tumorales de mama y macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  diferenciados a partir de monocitos THP-1. Se emplearon otras tres líneas celulares de mama ER $\alpha$ + además de las células MCF-7 y cuatro líneas celulares de mama que no poseen el ER $\alpha$  (ER $\alpha$  -) para comparar de esta manera posibles diferencias entre estos dos grandes grupos.

En el caso de las células ER $\alpha$ + fueron utilizadas las líneas T-47D, ZR-75-1 y BT-474 y se obtuvieron resultados muy similares a los de las células MCF-7. En todos los casos las células ER $\alpha$ + co-cultivadas con macrófagos condicionados incrementan su tasa de proliferación ante el estímulo con suero fetal bovino (FBS) o estradiol en comparación con su contraparte sin macrófagos (MCF-7, T-47D y ZR-75-1  $P \leq 0,001$ ; BT-474  $P \leq 0,01$ ). Por su parte el estímulo con TNF- $\alpha$  de manera similar a lo observado en las células MCF-7 no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células ER $\alpha$ + en ausencia de macrófagos, mientras que en presencia de macrófagos el TNF- $\alpha$  indujo niveles de proliferación similares a los del FBS o estradiol ( $P \leq 0,0001$  con respecto al

control). El tratamiento con tamoxifeno no fue capaz de bloquear la proliferación inducida por  $\text{TNF-}\alpha$  (T-47D y ZR-75-1  $P \leq 0,0001$ ; MCF-7 y BT-474  $P \leq 0,01$  con respecto al control) mostrando sólo una disminución parcial. Esto valida y le da robustez al fenómeno descrito ya que el mismo no se limita a una sola línea celular de mama ER+ (Fig. 9a).



**Figura 9: Los macrófagos condicionados inducen proliferación en células de cáncer de mama ER $\alpha$ + pero no en aquellas que son ER $\alpha$ -.**

Proliferación de células de cáncer de mama ER+ (a) o ER- (b) en presencia o ausencia de macrófagos THP-1 condicionados con  $\text{TNF-}\alpha$ . Las células fueron cultivadas por 48 h. separadas por una membrana semipermeable en presencia de los compuestos que se especifican en cada condición. Luego del tiempo especificado la proliferación se cuantificó midiendo la cantidad total de ADN por CyQuant. El experimento se realizó por cuadruplicado y se muestra el promedio más el error estándar de la media (SEM) expresados en unidades arbitrarias (u.a.). **Cntrl:** Medio DMEM sin factores adicionales, **FBS:** Suero fetal bovino, **E2:** Estradiol 1  $\mu\text{M}$ , **TNF:**  $\text{TNF-}\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu\text{M}$ . Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su control (Cntrl, del mismo color) ( $\Delta$  y  $\Psi$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .



Por otro lado los resultados de proliferación obtenidos con las células de mama que no poseen el receptor de estrógeno alfa fueron diametralmente opuestos. En estos ensayos se incluyeron a las líneas tumorales de mama SK-BR-3, MDA-MB-231, Hs 578T y HCC1395. Contrariamente a lo observado en las células de mama ER $\alpha$ + el co-cultivo de células de mama ER $\alpha$ - y macrófagos condicionados no afectó los niveles de proliferación de ninguna de estas líneas celulares. Ante el estímulo con FBS las células proliferaron de igual manera en presencia o ausencia de macrófagos y el estímulo con estradiol o TNF- $\alpha$  no indujo proliferación en ningún caso (Fig. 9b).

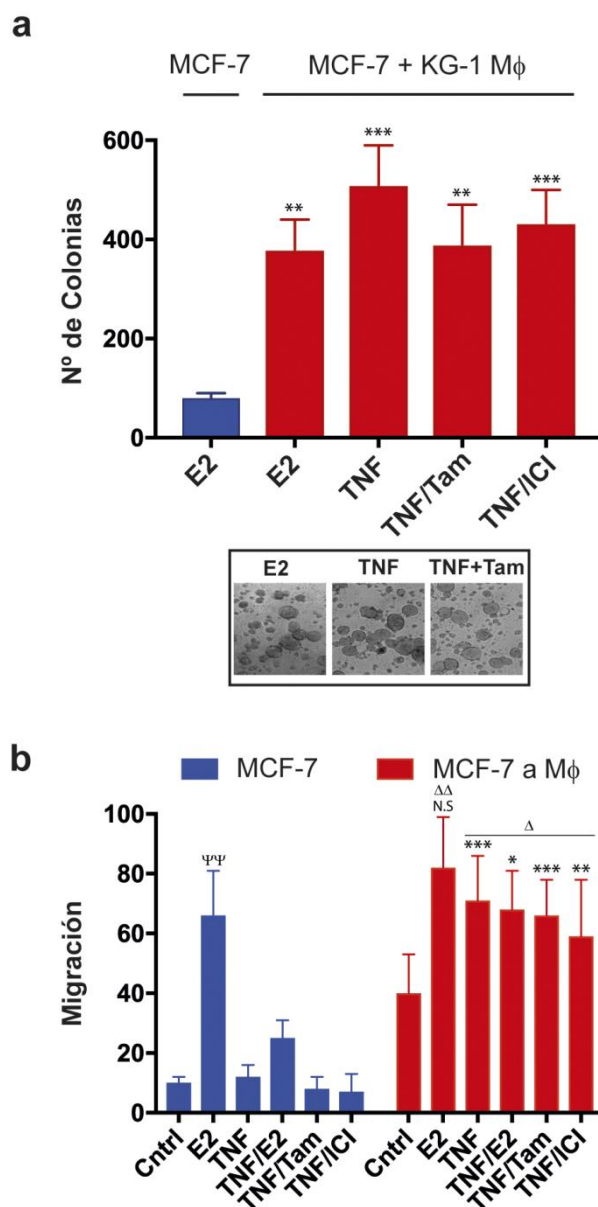
Estos resultados en su conjunto muestran que los macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  son capaces de favorecer e incrementar la proliferación de células tumorales de mama al parecer de una manera dependiente del receptor de estrógenos. El co-cultivo con macrófagos condicionados afectó el crecimiento de las cuatro líneas de mama ER $\alpha$ + evaluadas y de forma contundente no lo hizo en las otras cuatro líneas de mama ER $\alpha$ -. Debido a que los experimentos se realizaron de una manera que impidió el contacto directo entre las células de mama y los macrófagos los resultados sugieren que este efecto sería mediado por la liberación de ciertos factores solubles.

### **Macrófagos condicionados incrementan la capacidad migratoria e invasiva de células MCF-7.**

Para profundizar más en el estudio del rol que tienen los macrófagos en los tumores de mama ER $\alpha$ +, se estudió la capacidad invasiva y migratoria *in vitro* de células MCF-7 en presencia o ausencia de macrófagos condicionados.

La capacidad invasiva se evaluó mediante un ensayo de formación de colonias en agar blando donde células MCF-7 fueron cultivadas solas o junto con macrófagos condicionados. En este caso se utilizaron macrófagos diferenciados con PMA a partir de la línea monocítica KG-1 y el co-cultivo se realizó sin ningún tipo de barrera que impidiese el contacto directo entre los macrófagos y las células de mama. Se sabe que las células MCF-7 raramente forman colonias en agar blando y esto es precisamente lo que se observa al cuantificar el número de colonias formadas por células MCF-7 en ausencia de macrófagos estimuladas con estradiol. En estas condiciones las células MCF-7 formaron unas pocas colonias (Fig. 10a barra azul).





**Figura 10: Macrófagos condicionados con  $\text{TNF-}\alpha$  inducen mayor proliferación libre de adherencia y un aumento en la capacidad migratoria en células MCF-7.**

(a) Ensayo de formación de colonias en agar blando de células MCF-7 con o sin macrófagos condicionados KG-1 según se aclara. El medio de cultivo se preparó con DMEM sin rojo fenol, 0,36% p/v de agar y los factores correspondientes para cada condición. Cada dos días se agregó 100  $\mu\text{L}$  de medio de alimentación (ver materiales y métodos). Se cuantificó el número de colonias formadas al cabo de tres semanas de cultivo. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes más el error estándar de la media (SEM). Una imagen de contraste de fase representativa se muestra en la parte baja de la figura.

(b) Ensayo de migración de células MCF-7 en pocillo de inserción con membrana porosa (8  $\mu\text{m}$ ). En el pocillo inferior se colocaron macrófagos KG-1 condicionados en DMEM sin rojo fenol más los compuestos correspondientes (barras rojas) o solo el medio sin macrófagos (barras azules). Las células MCF-7 fueron previamente marcadas con un fluoróforo CellTrace Calcein Red-Orange (AM) y colocadas en el pocillo de inserción. Luego de 48 h se midió la fluorescencia en la parte inferior. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes más el error estándar de la media (SEM). **Cntrl:**

DMEM sin rojo fenol ni factores adicionales, **E2:** Estradiol 1  $\mu\text{M}$ , **TNF:**  $\text{TNF-}\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu\text{M}$ , **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu\text{M}$ . Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su control (Cntrl, mismo color) ( $\Delta$  y  $\Psi$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ .

Sin embargo, al cultivar las células MCF-7 junto con macrófagos condicionados el número de colonias formadas se incrementó sustancialmente ya sea ante estímulo de estradiol o de  $\text{TNF-}\alpha$  ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$  respectivamente). En este último caso el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue capaz de reducir significativamente el número de colonias formadas (Fig. 10a barras rojas).

Por su parte la capacidad migratoria fue evaluada mediante “Transwells” utilizando pocillos de inserción con membrana porosa. En este caso el tamaño de poro utilizado fue de 8  $\mu\text{m}$  y las células MCF-7 fueron previamente marcadas con un fluoróforo

(CellTrace Calcein Red-Orange) el cual permite realizar la cuantificación de las células que migran al pocillo inferior. Las células MCF-7 se colocan en la parte superior de la membrana semipermeable del pocillo de inserción con medio DMEM sin rojo fenol ni factores y en el pocillo inferior se colocan los macrófagos condicionados en medio DMEM sin rojo fenol con o sin factores según se aclara en cada condición. En los casos en los que no se colocan macrófagos en el pocillo inferior éstos sólo contienen el medio con los factores respectivos. Cuando las células MCF-7 fueron cultivadas solas en la parte superior del pocillo de inserción lograron migrar a través de la membrana semipermeable hacia el pocillo inferior sólo con la adición de estradiol al medio ( $P \leq 0,01$ ). Ante el estímulo con  $\text{TNF-}\alpha$  las células MCF-7 no migraron y tampoco lo hicieron al ser estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$  y E2 de forma conjunta (Fig. 10b barras azules).

En contraste, la sola presencia de macrófagos condicionados en el pocillo inferior causó que las células MCF-7 migren en al ser expuestos a los diferentes tratamientos. Las células MCF-7 migraron dirigidas por estradiol,  $\text{TNF-}\alpha$  o ambos factores juntos obteniéndose valores de migración muy similares en los tres casos ( $P \leq 0,01$  con respecto al control sin macrófagos). Por su parte, el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue capaz de inhibir la migración inducida por  $\text{TNF-}\alpha$  ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente con respecto al control sin macrófagos). Parece haber un incremento en la migración de las células MCF-7 control (sin E2 y  $\text{TNF-}\alpha$ ) hacia los macrófagos, pero dicho incremento no es significativamente diferente con respecto a la migración de las células MCF-7 control sin macrófagos. (Fig. 10b barras rojas).

Estos resultados en su conjunto muestran que los macrófagos condicionados con  $\text{TNF-}\alpha$  pueden incrementar la capacidad migratoria e invasiva de células de cáncer de mama ER+ dotando de propiedades altamente agresivas a células tumorales que se caracterizan por su baja capacidad invasivas, si se las compara con células de mama HER2+ o triple negativas [139, 140].

### **Los TAMs favorecen una mayor tasa de crecimiento y resistencia endócrina en tumores de xenoinjerto formados a partir de células MCF-7.**

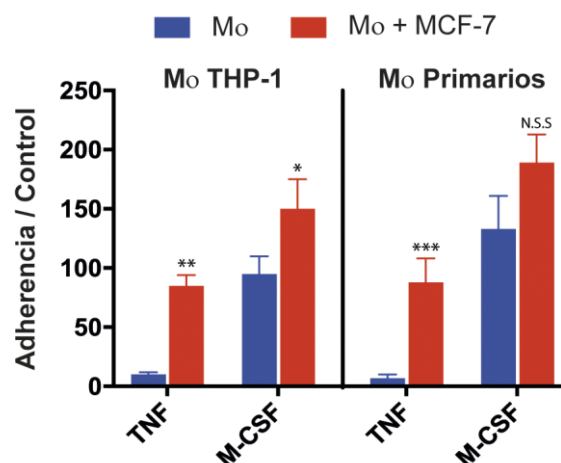
Se decidió evaluar el efecto de los macrófagos sobre el crecimiento de tumores de xenoinjerto en un modelo *in vivo* murino. Como se explicó anteriormente, lo que ocurre normalmente en un tumor es que las células liberan diferentes factores quimiotácticos como MCP-1 que atraen a los monocitos desde el torrente sanguíneo. Una vez en el sitio, los monocitos diferencian a macrófagos estimulados por factores tales como M-

CSF que las mismas células tumorales liberan. Por ello surgió la pregunta de que si al inyectar en un ratón de manera conjunta células MCF-7 junto con monocitos, estos últimos podrían diferenciar a macrófagos *in situ*, producto de los factores liberados al micro-medioambiente por las mismas células tumorales.

Como paso previo, esto mismo fue probado *in vitro* realizando co-cultivos de células MCF-7 con monocitos primarios (obtenidos de sangre periférica) o de la línea celular THP-1 no condicionados. Estos co-cultivos se hicieron empleando pocillos de inserción con membrana semipermeable, como la utilizada en los ensayos de proliferación, cuyos poros tienen 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro. En la parte superior de la membrana porosa se colocaron las células MCF-7 (Fig. 11 barras rojas) o se dejó vacío (Fig. 11 barras azules) y en el pocillo inferior se ubicaron los monocitos, los cuales fueron previamente marcados con el fluoróforo (CellTrace Calcein Red-Orange) para la posterior cuantificación. El criterio de diferenciación de los monocitos a macrófagos se basó en la capacidad de adherirse a la placa de cultivo de estos últimos sin poder ser removidos por lavados con PBS (buffer fosfato) [141].

Los resultados mostraron que ante el estímulo con M-CSF tanto los monocitos primarios como los de la línea celular THP-1 diferenciaron a macrófagos tanto en ausencia o presencia de células MCF-7. Se observa una tendencia a que los monocitos diferencien más en presencia de las células MCF-7, pero esta diferencia es significativa solo para los monocitos de la línea THP-1 ( $P \leq 0,05$ ) pero no para los monocitos primarios.

Por otro lado, en respuesta al estímulo con  $\text{TNF-}\alpha$  se observa una clara diferencia entre los monocitos con células MCF-7 y los monocitos solos. Ambos tipos de monocitos, primarios y de la línea celular THP-1, diferenciaron a macrófagos significativamente más ante la presencia de las células MCF-7 ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente). Mientras que en ausencia de las células tumorales de mama los niveles de diferenciación alcanzados son del orden de 10 veces menos (Fig. 11).



**Figura 11: La interacción con células MCF-7 favorece que monocitos diferencien a macrófagos ante un estímulo de  $\text{TNF-}\alpha$**

Se midió la diferenciación de monocitos primarios humanos (panel derecho) y de monocitos THP-1 (panel izquierdo) en presencia (barras rojas) o ausencia de células MCF-7 (barras azules). Las células se colocaron en pocillos de inserción con membrana porosa (poro  $0,4\ \mu\text{m}$ ). Los monocitos fueron marcados previamente con el fluoróforo CellTrace Calcein Red-Orange y colocados en el pocillo inferior. La diferenciación se midió por la intensidad de fluorescencia de las células adheridas a la placa de cultivo expresada como adherencia respecto al control. Se consideró como control interno la fluorescencia de la misma línea monocítica en medio sin factores adicionales. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes más el error estándar de la media (SEM). **MO:** monocitos **TNF:**  $\text{TNF-}\alpha$   $1\ \text{ng/mL}$ , **M-CSF:**  $10\ \text{ng/mL}$ . (\*) Diferencia estadística dentro de cada tratamiento. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; N.S.S = no hay diferencia significativa.

En base a este resultado *in vitro* existiría la posibilidad de que los monocitos pudieran diferenciar *in situ* a macrófagos al interactuar con las células MCF-7 en un modelo animal. En este experimento *in vivo* se busca comprobar si los efectos observados *in vitro*, en cuanto a un aumento en la agresividad de las células MCF-7 producto de la intercomunicación con los macrófagos condicionados vía factores solubles, tienen una correlación en un modelo animal.

Para ello se utilizaron ratones inmunodeficientes Nude (Nu/Nu) los cuales poseen un timo rudimentario y por tanto carecen de linfocitos T. La falta de linfocitos T de estos ratones permite que se les implanten células de origen humano sin que sean atacadas y destruidas por el SI. Además, a todos los ratones se les colocó de forma subcutánea una cápsula de liberación lenta de estradiol ya que las células MCF-7 dependen del estímulo de dicha hormona para proliferar y crecer *in vivo*. A cada ratón se le inyectó en uno de los flancos traseros una suspensión de células MCF-7 mezcladas con monocitos THP-1 indiferenciados. Se mantuvo una relación de  $1,2 \times 10^6$  células MCF-7 por cada  $0,4 \times 10^6$

monocitos. En el caso de los ratones control se les inyectó solamente  $1.2 \times 10^6$  células MCF-7 sin monocitos. Se permitió que los tumores formados crecieran hasta alcanzar un volumen aproximado de  $500 \text{ mm}^3$  antes de comenzar con el tratamiento con antagonistas del ER.

Con respecto a la formación de los tumores de xenoinjerto, un dato interesante es que 35 de 50 ratones inyectados con sólo células MCF-7 generaron tumor, es decir que se observó una eficiencia del 70 %. Mientras que en los ratones inyectados con la mezcla de células MCF-7 y THP-1 esa eficiencia fue del 96 %, 48 de 50 ratones formaron tumor. Luego de dos semanas posteriores a la fecha de inyección, los tumores formados por la mezcla de células MCF-7 y monocitos fueron significativamente de mayor tamaño a los tumores formados por las células MCF-7 sin monocitos ( $P \leq 0,001$ ) y por lo tanto este grupo alcanzó antes el volumen establecido para comenzar con el tratamiento (Fig. 12a).

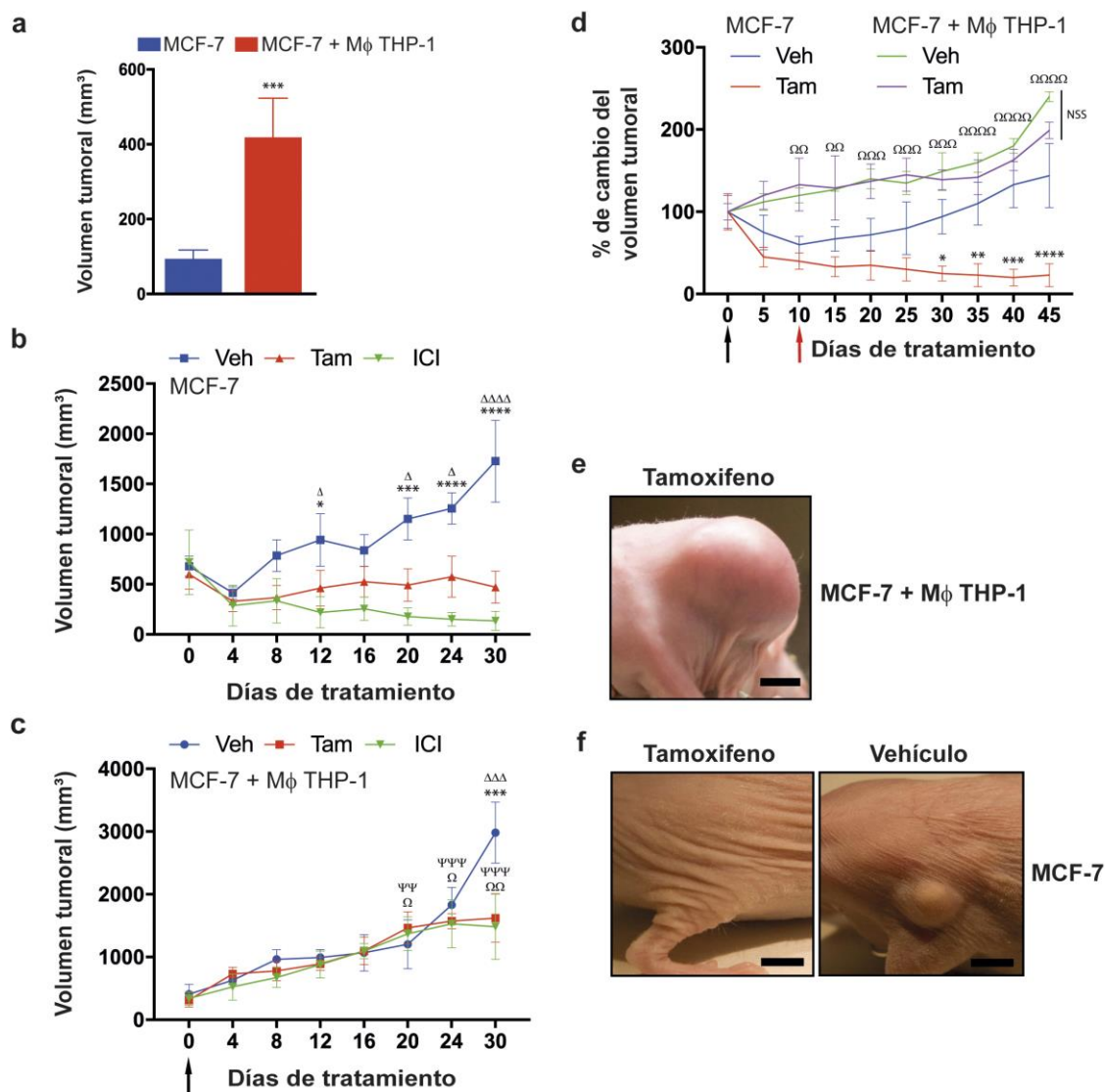
Los ratones inyectados con células MCF-7 solas fueron divididos en tres grupos y lo mismo se hizo con los ratones inyectados con células MCF-7 junto con monocitos THP-1. Cada uno de estos grupos fueron tratados con tamoxifeno, ICI 182,780 o solamente con vehículo.

Como era de esperar, el tratamiento con tamoxifeno pudo bloquear la progresión y el crecimiento de los tumores formados a partir de células MCF-7 solas ( $P \leq 0,0001$  al día 30). Por otra parte el tratamiento con ICI 182,780, no sólo inhibió el crecimiento de estos tumores sino que indujo una regresión de los mismos ( $P \leq 0,0001$  al día 30) (Fig. 12b).

Dado que las células MCF-7 previamente habían mostrado capacidad de proliferar y migrar en ausencia total de estradiol cuando son co-cultivadas con macrófagos y estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$ , se retiró la cápsula de estradiol al conjunto de ratones que habían sido inyectados con la mezcla de células MCF-7 y monocitos THP-1 antes de comenzar con los tratamientos (Fig. 12c). Vale aclarar además, que estos ratones recibieron los mismos tratamientos que el grupo inyectado con células MCF-7 solas.

Los tumores que fueron formados a partir de la mezcla de células MCF-7 y monocitos THP-1 continuaron creciendo a pesar de la quita de la cápsula subcutánea de estradiol como se observa en el grupo tratado con vehículo ( $P \leq 0,0001$  al día 30 con respecto al volumen inicial) (Fig. 12c). La curva de crecimiento de estos tumores no difiere significativamente de la de los tumores formados con células MCF-7 solas tratados con vehículo. Llamativamente, los tratamientos con tamoxifeno o ICI 182,780

tampoco pudieron frenar el crecimiento de estos tumores de manera eficiente. De hecho, prácticamente no se observan diferencias entre estas curvas y la de los ratones tratados con vehículo. Recién al día 30 se observa una diferencia significativa que nos permiten distinguir a los dos grupos de ratones tratados con tamoxifeno o ICI 182,780 del grupo control ( $P \leq 0,001$  al día 30).



**Figura 12: Los TAMs causan que tumores de xenoinjerto formados a partir de células MCF-7 crezcan a mayor tasa y de una manera independiente de estradiol.**

**(a)** Ratones inmunodeprimidos (Nu/Nu) fueron implantados con una cápsula de liberación lenta de estradiol y se les inyectó en el flanco derecho  $1.2 \times 10^6$  células MCF-7 solas (n=37) o en conjunto con  $0.4 \times 10^6$  monocitos THP-1 (n=48). Se muestra el promedio más el error estándar de la media (SEM) de los volúmenes alcanzados luego de 2 semanas del día de la inyección \*\*\*  $P < 0.001$ .

Los tumores formados a partir de células MCF-7 solas **(b)** o con monocitos THP-1 **(c)** al alcanzar un volumen aproximado de 500 mm<sup>3</sup> fueron tratados con tamoxifeno (10 mg/Kg), ICI 182,780 (10 mg/Kg) o solución vehículo. Los ratones recibieron una dosis cada 4 días (n=8 por grupo). A los ratones que se les inyectaron células MCF-7 conjuntamente con monocitos **(c)** se les removió la cápsula de estradiol (flecha negra) antes de comenzar con el tratamiento. **(d)** Se

generaron tumores de xenoinjerto de la misma manera que en **(b)**, líneas azules y rojas) y **(c)**, líneas verde y violeta). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 500 mm<sup>3</sup> se removió la cápsula de estradiol (Flecha negra) y se comenzó con el tratamiento. Los ratones recibieron dosis de tamoxifeno (10 mg/Kg) o vehículo cada 5 días (n=8 por grupo). En el día 10 la cápsula de estradiol fue reimplantada en todos los ratones (flecha roja) sin interrumpir el tratamiento hasta el día 45. Se muestra el cambio promedio del volumen tumoral considerando el volumen inicial (día 0) de cada tumor como el 100 % con su respectivo error (SEM). **(e)** Imagen ilustrativa de los tumores formados por células MCF-7 y monocitos THP-1 luego de 30 días de tratamiento con tamoxifeno. **(f)** Imágenes ilustrativas de tumores formados a partir de células MCF-7 solas luego de 30 días de tratamiento con tamoxifeno o vehículo. Barra de escala 1 cm. Estadísticas para **b**, **c** y **d** \* = Veh vs Tam;  $\Delta$  = Veh vs ICI;  $\Omega$  = Tam (**b**) vs Tam (**c**);  $\Psi$  = ICI (**b**) vs ICI (**c**). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . NSS = no hay diferencia significativa.

De todas maneras, si se comparan las curvas de crecimiento de los tumores tratados con tamoxifeno o ICI 182,780 de la figura 12c con los de la figura 12b se observa claramente que la presencia de macrófagos hace que el tratamiento endocrino prácticamente no tenga efecto, mientras que en ausencia de los macrófagos dicho tratamiento logra frenar el crecimiento tumoral ( $P \leq 0,01$  (Tam) y  $P \leq 0,001$  (ICI) al día 30).

Se realizó un segundo experimento *in vivo* similar al anterior, pero en este caso las cápsulas subcutáneas de estradiol fueron retiradas de todos los ratones del experimento al comienzo del tratamiento por un período de 10 días (Fig. 12d). Luego se volvieron a colocar y se mantuvieron hasta el final del experimento. La falta de estradiol provocó que los tumores de xenoinjerto formados por las células MCF-7 solas comiencen a sufrir una marcada regresión siendo mayor aún para el grupo tratado con tamoxifeno ( $P \leq 0,05$  (Veh) y  $P \leq 0,01$  (Tam) al día 10). Al re-implantarse nuevamente la cápsula de estradiol al día diez, se observó que los tumores sin macrófagos del grupo tratado con vehículo comenzaron a crecer y ganar volumen otra vez. En cambio, los tumores del grupo tratado con tamoxifeno permanecieron prácticamente estáticos mostrando una leve regresión a pesar de la disponibilidad sistémica de la hormona ( $P \leq 0,05$  al día 30 y  $P \leq 0,0001$  al día 45). Esto pone en evidencia la dependencia de estos tumores al estradiol para poder crecer (Fig. 12d).

Los tumores formados a partir de la mezcla de células MCF-7 junto con monocitos THP-1 llamativamente continuaron creciendo luego de que la cápsula de estradiol fuera removida ( $P \leq 0,05$  al día 10), no observándose diferencias significativas entre los grupos tratados con tamoxifeno o vehículo. Tampoco hubo ningún cambio significativo en el crecimiento tumoral luego de que la cápsula de estradiol fuera re-implantada. Se

observa una diferencia muy marcada entre las curvas de crecimiento de los tumores con y sin macrófagos tratados con tamoxifeno ( $P \leq 0,001$  al día 20 y  $P \leq 0,0001$  al día 45) (Fig. 12d).

En la figura 12e y 12f se muestran imágenes representativas de los tumores formados por las células MCF-7 en presencia de macrófagos THP-1 o sin macrófagos respectivamente luego de 30 días de tratamiento con tamoxifeno.

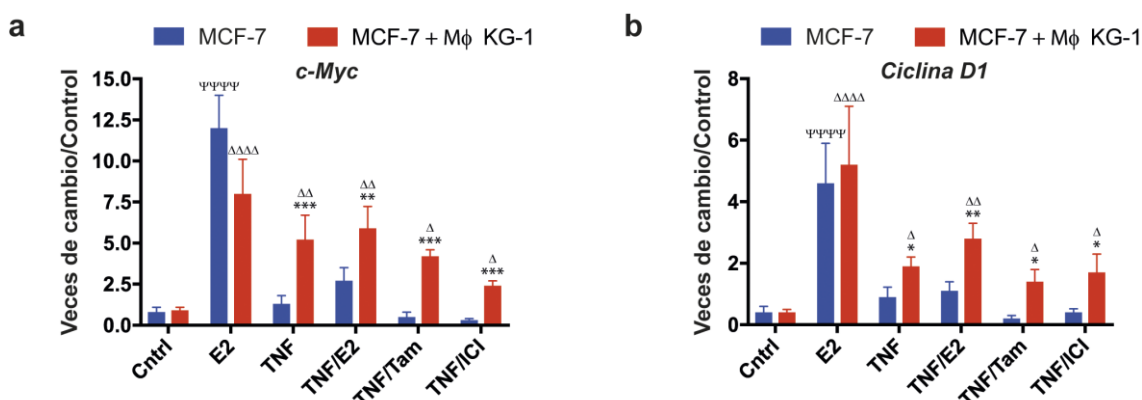
Estos hallazgos confirman que los TAMs tienen un efecto sumamente negativo al volver los tumores de mama ER $\alpha$ + resistentes a los tratamientos adyuvantes convencionales que se basan en el uso de antagonistas del receptor de estrógenos.

### **TNF- $\alpha$ induce la expresión de los genes *ciclina D1* y *c-Myc* en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados.**

La expresión de los genes de *ciclina D1* y *c-Myc* es requerida para la proliferación dependiente de estrógenos en células de cáncer mama [132]. Para conocer su implicancia en el fenómeno de resistencia endócrina en células MCF-7 mediado por macrófagos, en una primera instancia se evaluaron los niveles de expresión de *ciclina D1* y *c-Myc* en células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos condicionados bajo el tratamiento con E2, TNF- $\alpha$ , E2/TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ /Tamoxifeno y TNF- $\alpha$ /ICI 182,780 (Fig. 13).

Como era de esperar, ambos genes se sobre-expresan en las células MCF-7 cuando son estimuladas con estradiol ( $P \leq 0,0001$ ). Por su parte el estímulo con TNF- $\alpha$  no es capaz de inducir la expresión de ninguno de estos genes (Fig. 13a y 13b barras azules). Sin embargo, cuando las células MCF-7 son co-cultivadas con macrófagos condicionados el estímulo con TNF- $\alpha$  es suficiente para inducir la expresión de *c-Myc* y de *ciclina D1* (Fig. 13a y 13b barras rojas). Los niveles de expresión que se alcanzaron son un poco menores a los conseguidos con el estímulo de estradiol pero igualmente significativos ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente). Por su parte el tratamiento con los inhibidores del receptor de estrógenos sólo redujo parcialmente la expresión de *c-Myc* y de *ciclina D1* ante el estímulo con TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,05$ ). Esto ubica a ambos genes como potenciales efectores en respuesta al co-cultivo con macrófagos condicionados.





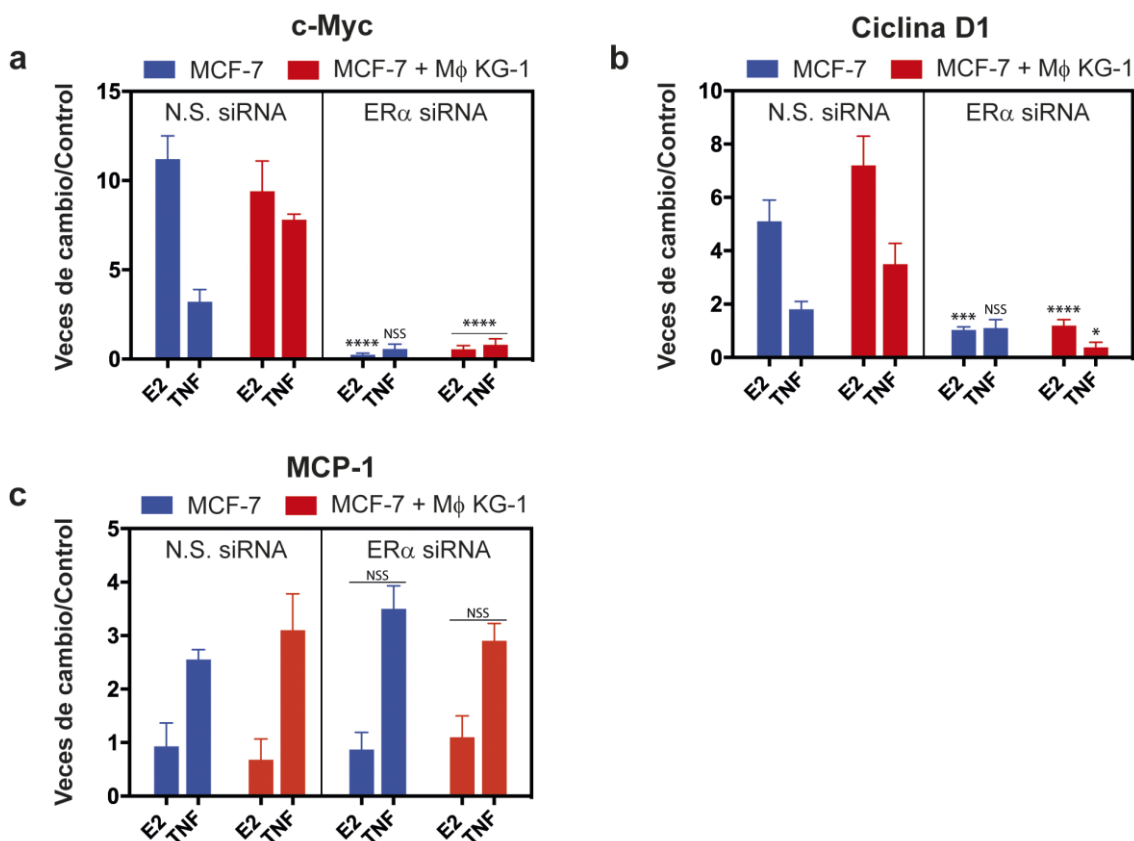
**Figura 13: TNF- $\alpha$  induce la expresión de los genes ciclina D1 y c-Myc en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados.**

Nivel de expresión de los genes *c-Myc* (a) y *ciclina D1* (b) en células MCF-7 en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados luego de 2 h. de tratamiento con los compuestos indicados. Se cuantificó por RT-qPCR el nivel relativo de mRNA de cada gen con respecto a su control calculado mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Se utilizó como control interno la expresión del gen 18S. **Cntrl:** DMEM sin rojo fenol, **E2:** Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF:** TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su control (Cntrl, mismo color) ( $\Delta$  y  $\Psi$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

Si bien la proliferación de las células MCF-7 mediada por los macrófagos condicionados ante estímulo con TNF- $\alpha$  demostró ser independiente de estradiol, las células de mama ER $\alpha$ - no respondieron al estímulo de TNF- $\alpha$  en presencia de macrófagos condicionados. Por ello, la pregunta que surge es si el ER $\alpha$  es necesario para que los macrófagos condicionados ejerzan su efecto sobre las células de mama. Para dar respuesta a dicha pregunta, se bloqueó la expresión del gen que codifica para el ER $\alpha$  utilizando un siRNA. La pérdida del ER $\alpha$  en las células MCF-7 impidió la inducción de expresión de *ciclina D1* y *c-Myc* mediada por el estímulo con TNF- $\alpha$  en presencia de macrófagos condicionados ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,0001$  respectivamente) (Fig. 14a y 14b).

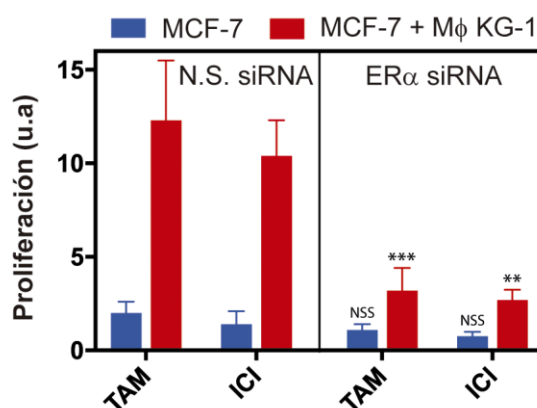
Además, el hecho de bloquear la expresión del ER $\alpha$  en las células MCF-7 fue suficiente para inhibir significativamente su proliferación inducida por los macrófagos condicionados ante el estímulo con TNF- $\alpha$  (Fig. 15). Esto indicaría que el ER $\alpha$  de las células de mama tiene una participación fundamental en la activación de genes claves como *ciclina D1* y *c-Myc* y en la inducción de proliferación por parte de los macrófagos condicionados, si bien el fenómeno es independiente de estradiol.

Por otro lado la inhibición del *ERα* por siRNA no tuvo ningún efecto sobre la expresión del gen de *MCP-1* (Fig. 14c). Esto indicaría que el reclutamiento de monocitos y el nivel de macrófagos infiltrados en el tumor no se verían reducidos ante la ausencia del *ERα* pero sí sus efectos adversos.



**Figura 14:** La expresión de los genes *c-Myc* y *ciclina D1* en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados depende de *ERα*.

Nivel de expresión de los genes *c-Myc* (a), *ciclina D1* (b) y *MCP-1* (c) en células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados luego de 2 h de estímulo con los compuestos que se especifican en la figura. Las células MCF-7 fueron previamente tratadas con siRNA contra *ERα* o con siRNA control no silenciante (N.S.) por 48 h. Se cuantificó por RT-qPCR el nivel relativo de mRNA de cada gen con respecto a su control (células sin estimular) calculado mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Se utilizó como control interno la expresión del gen de beta actina. **E2:** Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF:** TNF- $\alpha$  1 ng/mL. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto al mismo tratamiento con N.S siRNA (\*). \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ . NSS = no hay diferencia significativa



**Figura 15: La proliferación de las células MCF-7 mediada por macrófagos condicionados depende del ERα**

Proliferación de células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados bajo el estímulo de TNF-α (1 ng/ml). Las células MCF-7 fueron tratadas con siRNA contra ERα o con siRNA control no silenciante (N.S.) y cultivadas por 48 h en presencia de tamoxifeno (1 μM) o ICI 182,780 (1 μM). La proliferación se cuantificó por el contenido total de ADN mediante CyQuant. Se observa el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM) expresado en unidades arbitrarias (u.a.). **Tam:** Tamoxifeno 1 μM, **ICI:** ICI 182,780 1 μM. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a las células MCF-7 tratadas con N.S siRNA en las mismas condiciones (Tam/ICI y Con MΦ/Sin MΦ) (\*). \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001. NSS = no hay diferencia significativa.

### **Macrófagos condicionados incrementan el reclutamiento de p65 y ER-α en el promotor de ciclina D1 y c-Myc en células MCF-7 estimuladas con TNF-α**

Se trató de dilucidar el mecanismo molecular subyacente por el cual los macrófagos condicionados ejercen su efecto sobre las células tumorales de mama ERα+ induciendo proliferación independiente de estradiol mediante el estímulo de TNF-α. Para ello se indagó sobre alguna posible diferencia entre las células MCF-7 cultivadas solas o con macrófagos condicionados en relación a los complejos de proteínas que operan sobre los promotores de los genes de *ciclina D1* y *c-Myc*.

Con este propósito se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) dirigidos contra el ERα y la sub-unidad p65 del factor de transcripción NF-kB. Es evidente que la inclusión de p65 en el análisis responde a la importancia que tiene el estímulo con TNF-α en este fenómeno, siendo la activación de NF-kB una de las principales vías de señalización activada por los receptores de TNF-α. Como ya se mencionó en la introducción, NF-kB está asociado con proliferación, supervivencia y resistencia endócrina de las células tumorales [142].

Además se hicieron inmunoprecipitaciones (IP) dirigidas contra los coactivadores SRC1 y CBP así como contra el correpresor NCoR. Estos cofactores pueden regular la

transcripción de NF- $\kappa$ B como de ER $\alpha$ . SRC1 y NCoR han sido involucrados en la regulación de resistencia a tamoxifeno en tumores de mama y CBP es un cofactor clave en la interregulación que existe entre ER $\alpha$  y NF- $\kappa$ B [127, 129, 133]. Finalmente también se determinó la presencia de la ARN polimerasa II (Pol II) y la marca de trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 (Me3-H3K4) como control positivo de genes activos (para más detalles ver materiales y métodos).

Estos resultados indican que en las células MCF-7 cultivadas en ausencia de macrófagos, el estímulo con estradiol promueve el reclutamiento del factor de transcripción ER $\alpha$  junto con p65 en los promotores de *ciclina D1* ( $P \leq 0,0001$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente) y *c-Myc* ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente) aunque p65 es reclutado en menor medida (Figs. 16a y 17a). El coactivador CBP se vio incrementado en ambos promotores ( $P \leq 0,0001$ ) mientras que el coactivador SRC1 aumentó sólo en el promotor de *ciclina D1* ( $P \leq 0,0001$ ) (Figs. 16c y 17c). En ambos genes se observó la presencia de la enzima Pol II y la marca de activación de la transcripción génica Me3-H3K4 también estaba presente en dicho locus ( $P \leq 0,001$  en todos los casos) (Figs. 16e y 17e).

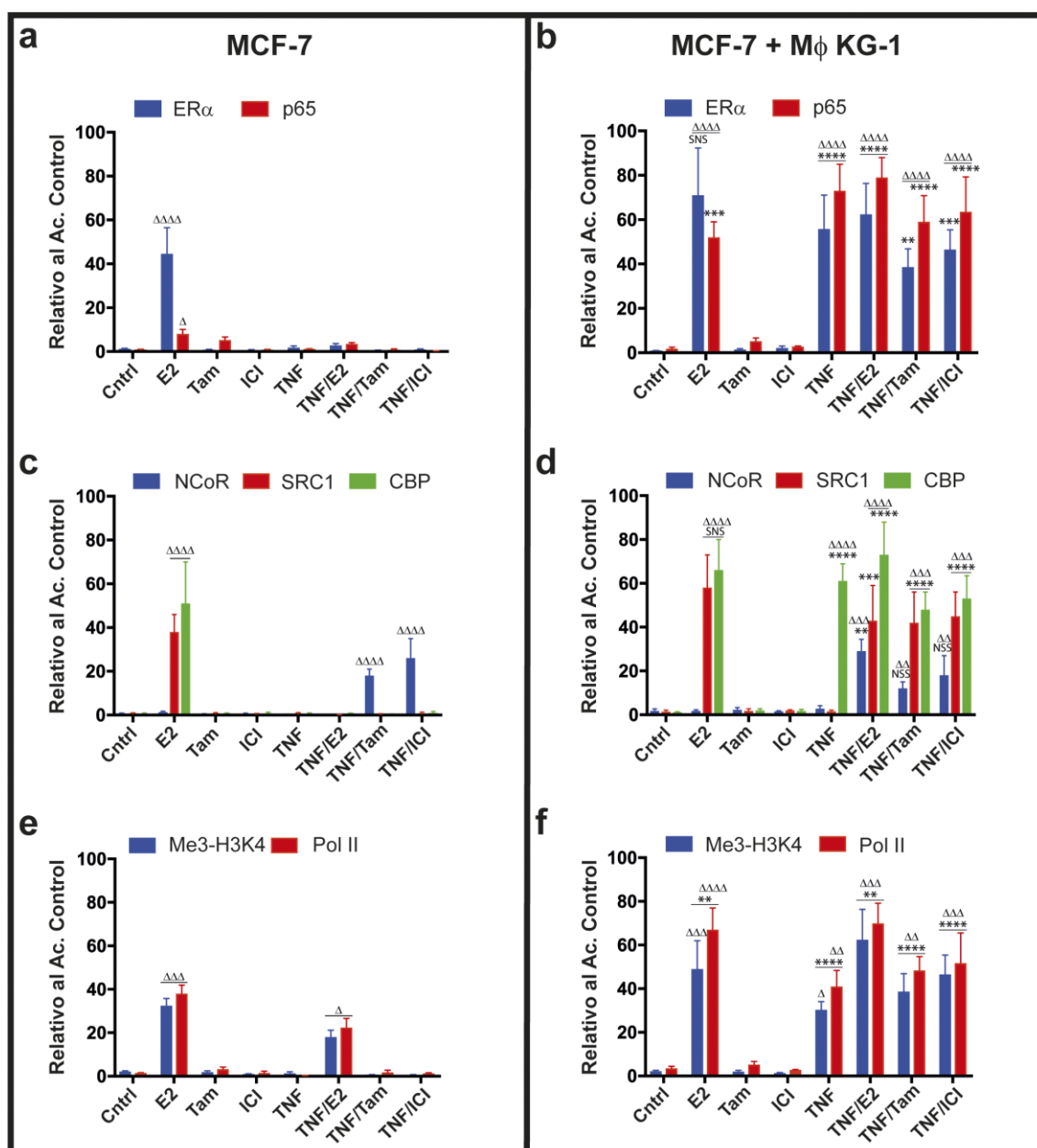
Por otro lado, el tratamiento de las células MCF-7 solas con TNF- $\alpha$  no produjo ningún efecto sobre el promotor de *ciclina D1* (Fig. 16a 16c y 16e). En cambio, en el promotor de *c-Myc* el estímulo con TNF- $\alpha$  produjo el reclutamiento de p65 ( $P \leq 0,001$ ) pero no se detectó la unión de ningún coactivador ni de la Pol II y tampoco hubo marca Me3-H3K4 (Fig. 17a 17c y 17e). Finalmente el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 ante el estímulo de TNF- $\alpha$  indujo el reclutamiento del correpresor NCoR tanto en el promotor de *ciclina D1* ( $P \leq 0,0001$  en ambos casos) como en el de *c-Myc* ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente) (Figs. 16c y 17c) y en este último caso impidió el reclutamiento de p65 (Fig. 17a).

En contraste, se observaron claras diferencias en los niveles de muchas proteínas reclutadas en los promotores de *ciclina D1* y de *c-Myc* en las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados con respecto a lo observado en las células MCF-7 sin macrófagos. Primeramente, ante el estímulo con estradiol se muestra un marcado aumento en los niveles de p65 unido a ambos promotores ( $P \leq 0,001$ ) (Figs. 16b y 17b). El nivel de ER $\alpha$  también incrementó en el promotor de *c-Myc* ( $P \leq 0,001$ ) pero dicho incremento no fue significativo para el promotor de *ciclina D1*. Con respecto a los coactivadores CBP y SRC1, éstos también se encuentran presentes en los dos casos (Figs. 16d y 17d). En el promotor de *ciclina D1* se observa un incremento en los

niveles de unión de la Pol II y la marca de Me3-H3K4 ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 16f), pero dicho incremento no fue significativo en el promotor de *c-Myc* (Fig. 17f).

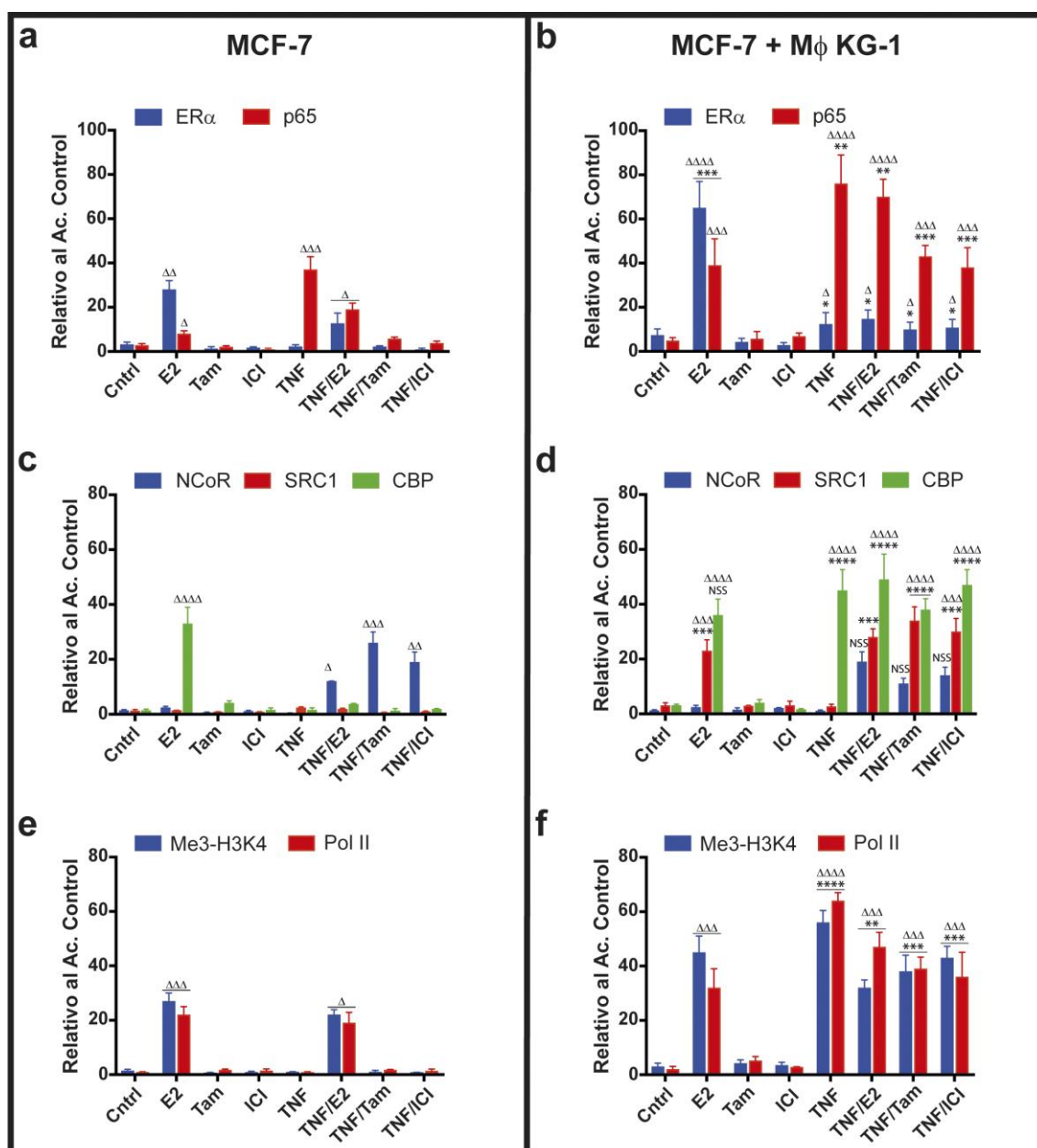
Con respecto al estímulo con TNF- $\alpha$  a las células MCF-7 cultivadas en presencia de macrófagos, en el promotor de *ciclina D1* se produjo el reclutamiento del factor de transcripción ER $\alpha$  y de p65 en altos niveles ( $P \leq 0,0001$ ) junto con el cofactor CBP ( $P \leq 0,0001$ ) (Fig. 16b y 16d respectivamente). Para el caso del promotor de *c-Myc* también se incrementó el reclutamiento de p65 ( $P \leq 0,01$ ) y el de ER $\alpha$  ( $P \leq 0,05$ ) junto con el coactivador CBP ( $P \leq 0,0001$ ) (Fig. 17b y 17d respectivamente). Además, el estímulo con TNF- $\alpha$  produjo la unión de la enzima Pol II a los promotores de ambos genes en alta proporción ( $P \leq 0,0001$ ) así como el aumento en la marca de Me3-H3K4 ( $P \leq 0,0001$ ) indicando genes transcripcionalmente activos (Figs. 16f y 17f).

El tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue capaz de impedir el reclutamiento del factor de transcripción ER $\alpha$  ni de p65 inducido por TNF- $\alpha$  en los promotores de *ciclina D1* ( $P \leq 0,0001$  en ambos casos) y de *c-Myc* ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,001$  respectivamente) (Figs. 16b y 17b). El principal cambio que se observó producto de dicho tratamiento fue con respecto a los cofactores (activadores y represores) que forman parte del complejo transcripcional. En el promotor de *ciclina D1* y *c-Myc* se indujo la unión del correpresor NCoR ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,0001$  respectivamente) pero al mismo tiempo también se reclutaron los coactivadores SRC1 ( $P \leq 0,0001$  en ambos promotores) y CBP ( $P \leq 0,0001$  en ambos promotores) (Figs. 16d y 17d). El reclutamiento de NCoR en el promotor de *ciclina D1* ante el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue capaz de impedir la unión de la Pol II ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$  respectivamente) ni de la marca de Me3-H3K4 ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$  respectivamente) dirigidas por el estímulo de TNF- $\alpha$  (Fig. 16f). Un resultado muy similar se observa para el caso del promotor de *c-Myc*, donde el estímulo con TNF- $\alpha$  induce el reclutamiento de la Pol II y la marca de Me3-H3K4 a pesar del tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 ( $P \leq 0,001$  en todos los casos) (Fig. 17f).



**Figura 16: Macrófagos condicionados inducen un aumento en el reclutamiento de p65 y ER- $\alpha$  en el promotor del gen *ciclina D1* en células MCF-7 junto con cambios en SRC-1, CBP y NCoR ante el estímulo con TNF- $\alpha$ .**

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de las proteínas ER $\alpha$ , p65 (paneles superiores), SRC-1, CBP y NCoR (paneles medios) y de la RNA polimerasa (Pol) II y de la histona 3 tri-metilada en la Lisina 4 (Me3-H3K4) (paneles inferiores) seguido de cuantificación por RT-qPCR del promotor de *ciclina D1*. Las células MCF-7 fueron cultivadas solas (**a**) o con macrófagos KG-1 condicionados (**b**) por 24 h. Luego se realizó un estímulo de 2 h. con los compuestos que se especifican. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM). **Cntrl**: DMEM sin rojo fenol ni el agregado de factores adicionales, **E2**: Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF**: TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam**: Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI**: ICI 182,780 1  $\mu$ M. **Ac. control**: Anticuerpo control (IgG). Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . N.S. = No hay diferencia significativa.



**Figura 17: Macrófagos condicionados inducen un aumento en el reclutamiento de p65 y ER- $\alpha$  en el promotor del gen *c-Myc* en células MCF-7 junto con cambios en SRC-1, CBP y NCoR ante el estímulo con TNF- $\alpha$ .**

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de las proteínas ER $\alpha$ , p65 (paneles superiores), SRC-1, CBP y NCoR (paneles medios) y de la RNA polimerasa (Pol) II y de la Lisina 4 tri-metilada en la histona 3 (Me3-H3K4) (paneles inferiores) seguido de cuantificación por RT-qPCR del promotor de *c-Myc*. Las células MCF-7 fueron cultivadas solas (**a**) o con macrófagos KG-1 condicionados (**b**) por 24 h. Luego se realizó un estímulo de 2 h. con los compuestos que se especifican. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM). **Cntrl**: DMEM sin rojo fenol ni el agregado de factores adicionales, **E2**: Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF**: TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam**: Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI**: ICI 182,780 1  $\mu$ M. **Ac. control**: Anticuerpo control (IgG). Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . N.S. = No hay diferencia significativa.



### **Rol de NF- $\kappa$ B en la proliferación de células MCF-7 mediada por macrófagos condicionados.**

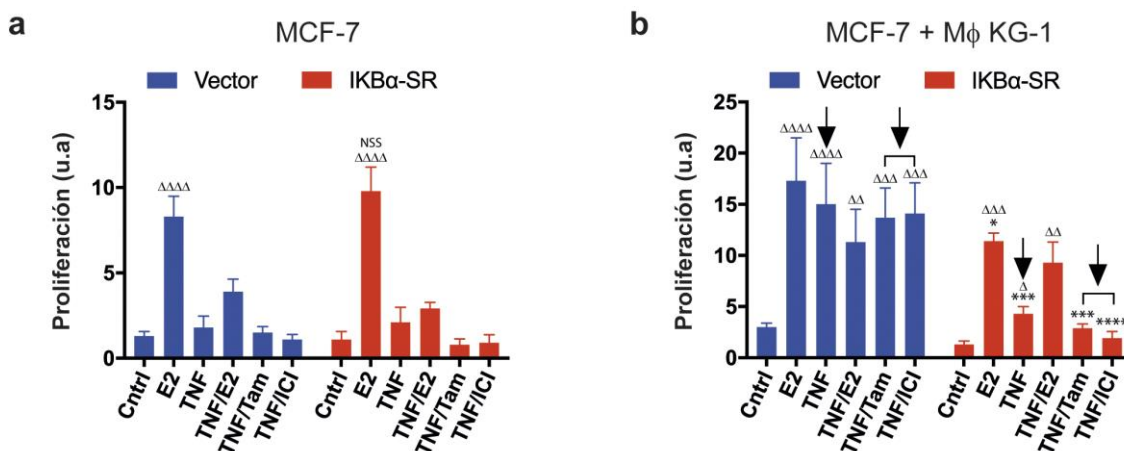
El experimento de ChIP descrito anteriormente sugiere que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B podría ser clave en la resistencia endócrina mediada por macrófagos condicionados en células de cáncer de mama ER $\alpha$ +. Para estudiar esta posibilidad, células MCF-7 fueron transfectadas con una mutante dominante negativa de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ . Como se explicó en la introducción, esta proteína forma un complejo con el dímero NF- $\kappa$ B secuestrando a dicho factor de transcripción en el citoplasma e impidiendo su relocalización al núcleo. I $\kappa$ B $\alpha$  mutada funciona como un súper represor de NF- $\kappa$ B ya que no puede ser fosforilada por el complejo de quinasas IKK las cuales son las encargadas de liberar a NF- $\kappa$ B de I $\kappa$ B $\alpha$ . De esta forma es posible bloquear la vía de NF- $\kappa$ B de forma permanente.

Se comparó entonces la proliferación de células MCF-7 con la vía de NF- $\kappa$ B inhibida o funcional. En este último caso se utilizaron células MCF-7 transfectadas con el vector vacío. Al analizar los niveles de proliferación de ambas líneas MCF-7 cultivadas solas (sin macrófagos) se pudo apreciar que el súper represor I $\kappa$ B $\alpha$  no afectó significativamente el nivel de proliferación dependiente de estradiol. Tampoco se observaron diferencias en ninguna de las otras condiciones de cultivo. Con la vía de NF- $\kappa$ B activa o bloqueada TNF- $\alpha$  no fue capaz de inducir proliferación en ningún caso (Fig. 18a).

En cambio, al cultivar las células MCF-7 en presencia de macrófagos KG-1 condicionados el estímulo con TNF- $\alpha$  indujo altos niveles de proliferación en las células MCF-7 con la vía de NF- $\kappa$ B funcional (vector) ( $P \leq 0,0001$ ), mientras que el bloqueo de dicha vía por medio del súper represor I $\kappa$ B $\alpha$  generó una drástica disminución de la proliferación mediada por TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 18b). El bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B también provocó una disminución en los niveles de proliferación inducidos por E2 ( $P \leq 0,05$ ). En este caso los niveles de proliferación de las células MCF-7 mediada por estradiol retornaron a un valor muy similar al de las células MCF-7 cultivadas solas ya que no se encuentran diferencias significativas entre estos valores. Además, El tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 en estas condiciones fue efectivo y logró bloquear totalmente la proliferación de las células MCF-7 cultivadas en presencia de macrófagos ante el estímulo con TNF- $\alpha$  (Fig. 18b, flechas negras). Estos resultados demuestran que el aumento en la tasa de proliferación y la resistencia a los antagonistas



del ER producto de la intercomunicación entre las células tumorales de mama con los macrófagos efectivamente dependen de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B.



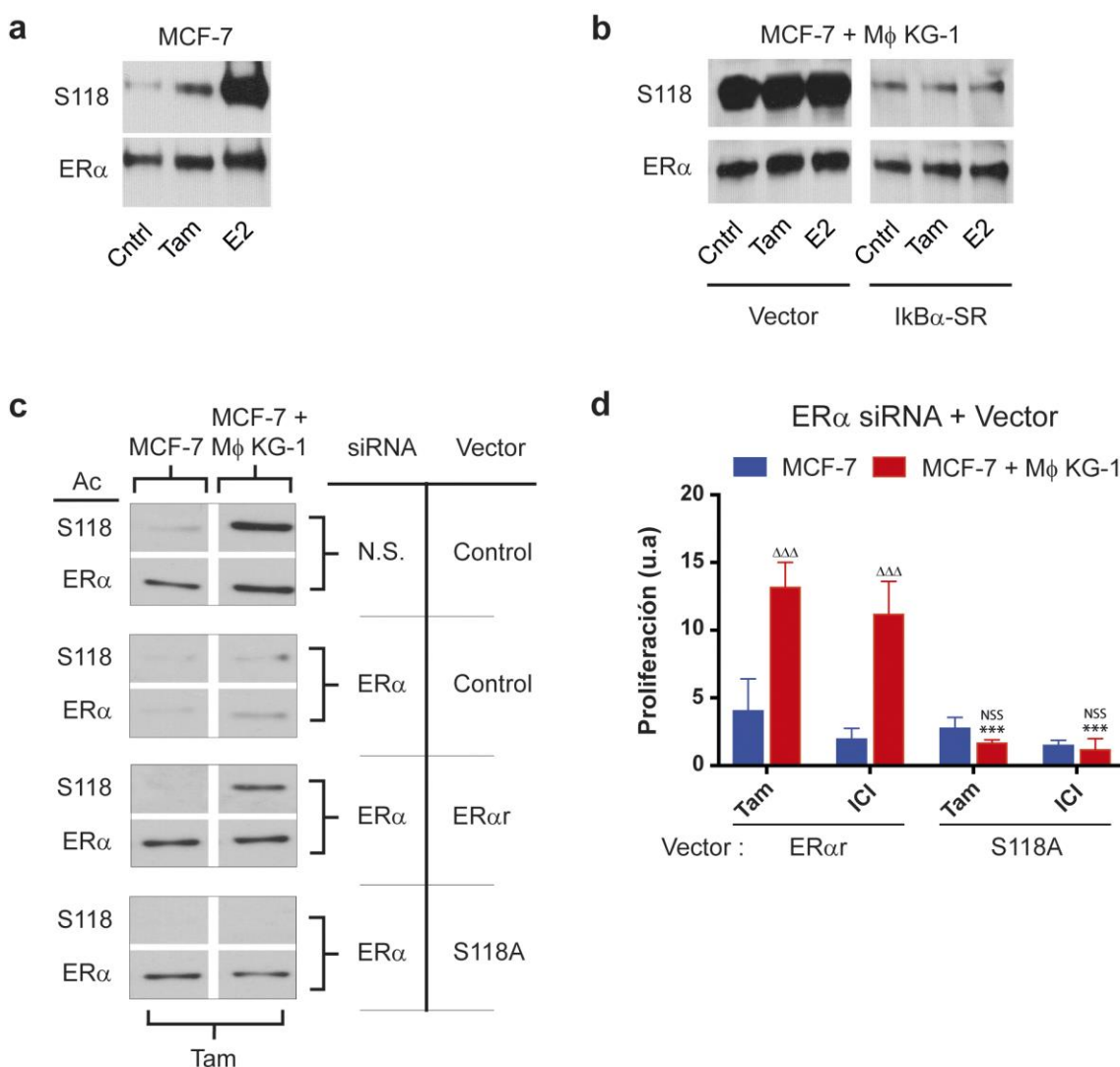
**Figura 18: La proliferación de las células MCF-7 mediada por macrófagos condicionados depende del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.**

Se cuantificó la proliferación de células MCF-7 transfectadas con un plásmido que expresa el súper represor I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR) o el vector vacío. Las células MCF-7 fueron cultivadas por 48 h y tratadas con los compuestos indicados en ausencia (a) o presencia (b) de macrófagos condicionados separados por una membrana semipermeable. La proliferación se midió por la concentración total de ADN utilizando el reactivo CyQuant. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM) expresado en unidades arbitrarias (u.a). **Cntrl:** DMEM sin R. fenol ni factores adicionales, **E2:** Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF:** TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento con el vector vacío (\* y flechas negras). 1 símbolo P  $\leq$  0,05; 2 símbolos P  $\leq$  0,01; 3 símbolos P  $\leq$  0,001; 4 símbolos P  $\leq$  0,0001. NSS = No hay diferencia significativa.

Hasta el momento se demostró que tanto el factor de transcripción NF- $\kappa$ B como el ER $\alpha$  son fundamentales en la proliferación independiente de estradiol de las células MCF-7. Por lo tanto, se decidió profundizar la investigación e indagar sobre la existencia de un posible vínculo entre la vía de NF- $\kappa$ B y la activación independiente de ligando del receptor nuclear ER $\alpha$ . Para ello, por medio de la técnica de Western Blot se evaluó el estado de fosforilación de ER $\alpha$  sobre la serina 118 (Ser-118). Esta fosforilación ha sido asociada en la clínica con resistencia a tamoxifeno y con un aumento en el reclutamiento de los coactivadores en el sitio donde se encuentra el elemento de respuesta a estradiol en el promotor de los genes diana [124].

Los resultados muestran que la estimulación con estradiol induce fosforilación del ER $\alpha$  en la Ser-118 (p-ER $\alpha$  Ser-118) en células MCF-7 cultivadas en ausencia de macrófagos, mientras que el tratamiento con tamoxifeno reduce considerablemente los niveles de p-ER $\alpha$  Ser-118 (Fig. 19a). En cambio, cuando las células MCF-7 son co-

cultivadas con macrófagos condicionados el ER $\alpha$  se fosforila en la Ser-118 tanto en ausencia como en presencia de estradiol y el tratamiento con tamoxifeno no es capaz de reducir el nivel de dicha fosforilación. Sin embargo, el bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B en las células MCF-7 mediante la transfección de un plásmido que codifica el súper represor IKB $\alpha$  provocó una disminución sustancial de p-ER $\alpha$  Ser-118 en todas las condiciones antes mencionadas (Fig. 19b). Esto indicaría que el estado de fosforilación de la Ser-118 del ER $\alpha$  mediado por macrófagos condicionados depende de NF- $\kappa$ B y es totalmente independiente de estradiol.



**Figura 19: NF- $\kappa$ B es esencial para la activación independiente de estradiol del ER $\alpha$  de células MCF-7 mediada por macrófagos condicionados.**

(a) Células MCF-7 fueron sincronizadas 48 h en DMEM sin rojo fenol y luego tratadas por dos horas según se indica. El Western Blot se reveló con anticuerpos anti ER $\alpha$  total o anti ER $\alpha$  fosforilado (p-ER $\alpha$  S118). (b) Células MCF-7 transfectadas con el súper represor IKB $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR) o vector vacío fueron co-cultivadas con macrófagos KG-1 condicionados por 24 h separados por membrana semipermeable (poro 0,4  $\mu$ m). Luego las células recibieron 2 h de estímulo con los ligandos especificados. El Western Blot de se reveló con anticuerpos anti ER $\alpha$

total o anti p-ER $\alpha$  S118. **(c)** Western Blot de células MCF-7 cultivadas solas (panel izquierdo) o con macrófagos KG-1 condicionados (panel derecho). Las células MCF-7 fueron transfectadas con un vector que expresa una proteína de ER $\alpha$  refractaria idéntica a la endógena (ER $\alpha$ r) o una variante mutada del ER $\alpha$ r (S118A) o con el vector vacío. Luego las células se trataron con siRNA contra el ER $\alpha$  endógeno o con siRNA no silenciante (N.S.). Se reveló con anticuerpos anti ER $\alpha$  total o anti p-ER $\alpha$  S118. **(d)** Proliferación de células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados, separadas por una membrana porosa (poro 0,4  $\mu$ m). Las células MCF-7 expresan el ER $\alpha$ r o el ER $\alpha$ r S118A y fueron tratadas con siRNA contra el ER $\alpha$  endógeno. La proliferación se cuantificó utilizando el reactivo CyQuant luego de 48 h de cultivo. Las células MCF-7 cultivadas solas recibieron estímulo de estradiol (1  $\mu$ M) y las que fueron co-cultivadas con macrófagos condicionados de TNF- $\alpha$  (1 ng/mL). La proliferación se midió por la concentración total de ADN. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM) expresado en unidades arbitrarias (u.a). **Cntrl:** DMEM sin R. fenol ni factores adicionales, **E2:** Estradiol 1  $\mu$ M, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento con ER $\alpha$ r (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . NSS = No hay diferencia significativa.

Por último, para demostrar la relevancia que tiene el p-ER $\alpha$  Ser-118 fue necesario estudiar la vinculación entre dicha fosforilación y la proliferación de las células MCF-7 inducida por macrófagos condicionados en ausencia de estradiol. Esto se realizó utilizando un siRNA que bloquea el ER $\alpha$  endógeno de las células MCF-7 en combinación con un vector que expresa una proteína funcional de ER $\alpha$  refractaria a siRNA (ER $\alpha$ r), la cual no puede ser blanco del siRNA que bloquea al ER $\alpha$  endógeno. Además, se empleó una proteína ER $\alpha$ r mutada en la serina 118, la cual fue reemplazada por una alanina (ER $\alpha$ r S118A) para impedir la fosforilación en el sitio.

Como se puede observar en la figura 19c el siRNA efectivamente bloqueó la expresión del ER $\alpha$  endógeno y la transfección con el vector que expresa el ER $\alpha$ r logró restaurar la expresión y fosforilación de dicha proteína. Con respecto a la proliferación mediada por macrófagos condicionados, las células MCF-7 con el receptor ER $\alpha$ r sin mutar lograron proliferar en ausencia de estradiol y bajo tratamiento de tamoxifeno o ICI 182,780. En estas células el ER $\alpha$ r se encuentra fosforilado en la Ser-118 mientras que en las células MCF-7 sin macrófagos esta fosforilación no se observa (Fig. 19c y 19d).

Por el contrario, si la proteína que es transfectada en las células MCF-7 para suplantar el ER $\alpha$  endógeno es ER $\alpha$ r S118A, estas células ahora no son capaces de restablecer la proliferación y la resistencia a tamoxifeno mediada por los macrófagos. Todos estos datos en su conjunto reflejan la importancia de NF-kB ya que además de participar formando parte de la maquinaria transcripcional de genes claves como *ciclina*

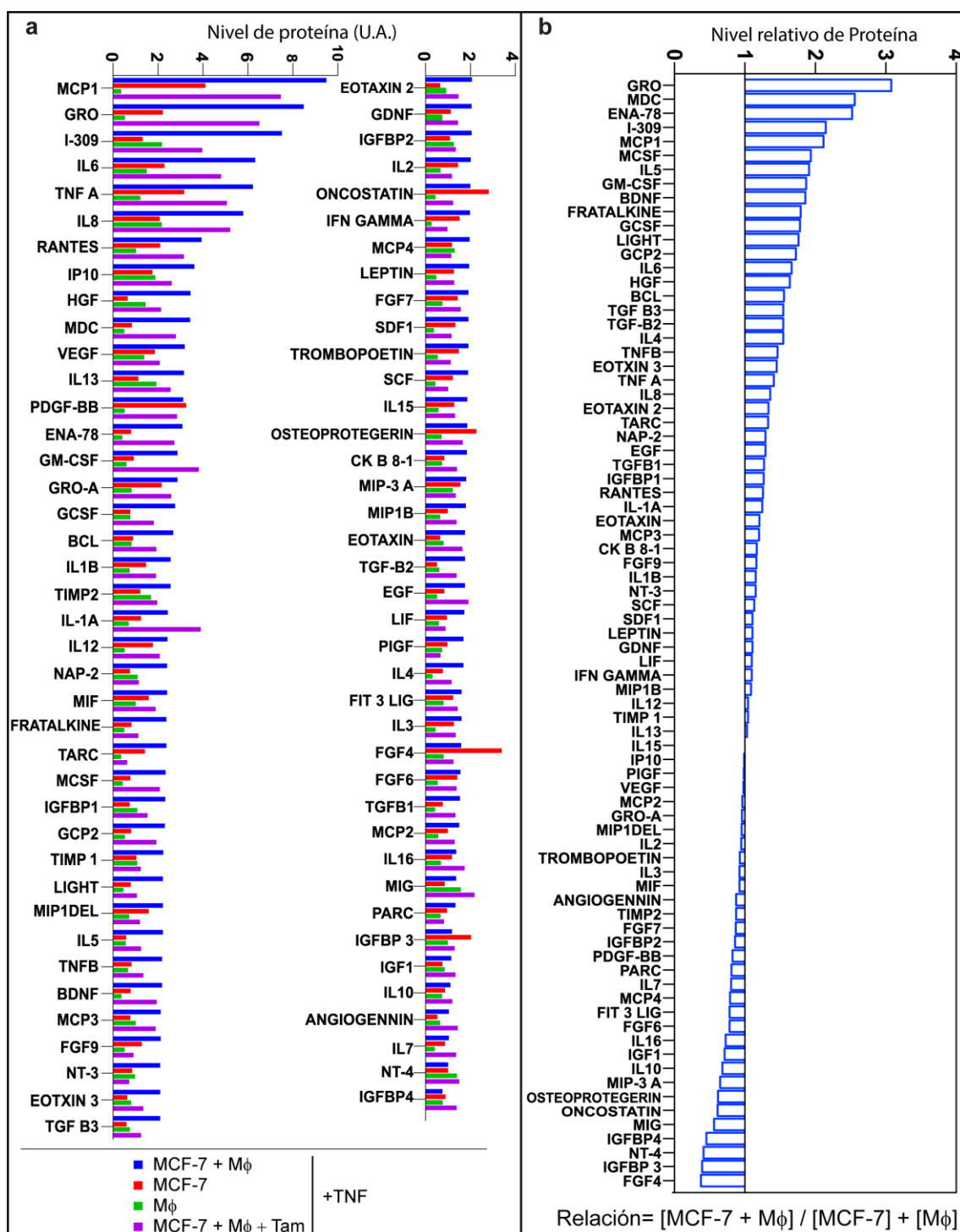
*D1* y *c-Myc* también está involucrado en la fosforilación del ER $\alpha$  independiente de ligando.

### **Rol de la vía de IL-6/STAT3 en la proliferación de células MCF-7 mediada por macrófagos.**

El hecho de que la inducción de la proliferación y migración de las células de cáncer de mama ER $\alpha$ + mediada por los macrófagos condicionados ocurra sin la necesidad de que haya contacto directo entre ambos tipos de células sugiere que este fenómeno debe estar siendo mediado por factores solubles. Para tratar de identificar los factores solubles involucradas en este proceso de intercomunicación celular que conducen a los efectos mencionados sobre las células MCF-7, se analizó el medio de cultivo de células MCF-7 solas, macrófagos KG-1 condicionados solos y del co-cultivo de células MCF-7 con macrófagos KG-1 condicionados (separados por una membrana semipermeable que no permite el paso de células).

Todos los cultivos celulares recibieron un estímulo inicial con TNF- $\alpha$  1 ng/mL durante 6 horas. Luego las células fueron lavadas y cultivadas en medio fresco sin la adición de factores por 24 horas. Posteriormente, se recolectaron los medios de cada uno de los cultivos para analizar el contenido de citocinas mediante el uso de una matriz de anticuerpos específicos para 79 citocinas. Para una mejor interpretación de los datos obtenidos se graficó la relación de los niveles de citocinas entre el medio condicionado del co-cultivo de ambos tipos de células con respecto a la suma de los medios condicionados de los cultivos individuales (Fig. 20).

Se puede observar que en el medio de cultivo de la mezcla de células MCF-7 y macrófagos KG-1 condicionados alrededor de un 59 % de todas las citocinas evaluadas incrementaron (valores mayores a 1), un 32 % disminuyó (valores menores a 1), y el 9 % restante se mantuvo sin cambios (valores aproximadamente iguales a 1). Es importante notar que los cambios en la expresión de estas citocinas se producen meramente por la influencia que los macrófagos condicionados ejercen sobre las células MCF-7 y viceversa (Fig. 20).



**Figura 20: Nivel de citocinas en el medio de cultivo de células MCF-7, macrófagos KG-1 o del co-cultivo de ambas líneas celulares.**

Células MCF-7 solas, macrófagos KG-1 solos y el co-cultivo de ambas líneas celulares fueron tratadas durante 6 h con 1 ng/mL de TNF- $\alpha$ , células sin estimular se emplearon como control. Luego las células fueron lavadas y cultivadas durante 24 h más. El perfil de citocinas presentes en el medio de cultivo fue analizado utilizando un “array” de anticuerpos. (a) Se muestran las citocinas que cambiaron más de dos veces con respecto al control. (b) Se muestra la relación de cada citocina en el co-cultivo con respecto a la suma de los cultivos por separado  $[(MCF-7 + M\phi) / (MCF-7) + (M\phi)]$ .

Todas estas variaciones reflejan la complejidad que existe en este fenómeno biológico de intercomunicación entre células tumorales de mama ER $\alpha$ <sup>+</sup> y macrófagos condicionados. Entre las citocinas que más aumentaron su secreción al medio se encuentran factores quimiotácticos como Gro, MCP-1, IL-8 y Rantes; varias citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , TNF- $\alpha$  y también GM-CSF el cual está asociado a la cascada inflamatoria. Sin embargo, también se observó un incremento en las citocinas IL-4 y TGF- $\beta$  que están involucradas en la inducción de un perfil de macrófagos tipo M2.

Con el objetivo de validar estos resultados se analizaron los niveles de expresión de algunos de los genes mencionados que normalmente responden al factor de transcripción NF- $\kappa$ B por RT-qPCR. Para ello, células MCF-7 fueron co-cultivadas con macrófagos condicionados separados por una membrana semipermeable. Luego de dos horas de estímulo con TNF- $\alpha$ , en presencia o ausencia de antagonistas del ER, las células fueron cosechadas para su análisis.

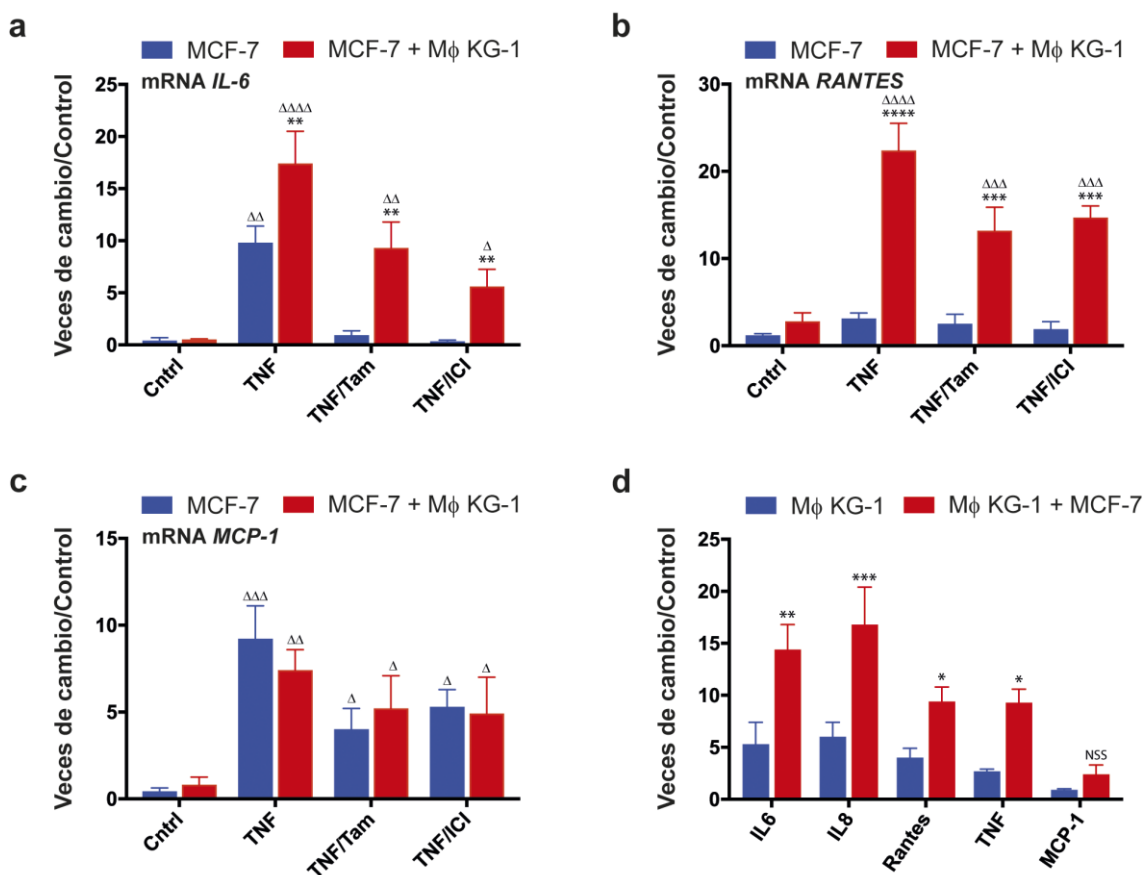
Los resultados indican que en las células MCF-7 el gen de *IL-6* se expresa ante el estímulo con TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,01$ ) y que la presencia de los macrófagos condicionados hace que dicha expresión sea aún mayor ( $P \leq 0,01$ ). El tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 logra inhibir por completo la expresión de *IL-6* en ausencia de macrófagos pero en presencia de los mismos la inhibición es parcial detectándose niveles significativos del mRNA de *IL-6* ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente) (Fig. 21a).

Con respecto al gen *Rantes*, se observa que el tratamiento con TNF- $\alpha$  en células MCF-7 solas no induce su expresión a niveles significativamente diferentes al control. Pero en presencia de los macrófagos condicionados las células MCF-7 expresan altos niveles del mRNA de *Rantes* ante el estímulo con TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,0001$ ). El tamoxifeno o ICI 182,780 solo produjeron una disminución parcial de los niveles del mRNA de *Rantes* ante el estímulo con TNF- $\alpha$  en presencia de macrófagos condicionados pero no fue capaz de impedir su expresión ( $P \leq 0,001$  en ambos casos) (Fig. 21b).

Por su parte la expresión de *MCP-1* fue inducida por TNF- $\alpha$  tanto en ausencia como en presencia de macrófagos ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente). El tratamiento con los antagonistas del ER produjo una reducción parcial en la expresión de *MCP-1* mediada por TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 21c). En ningún caso hubo diferencias significativas causadas por el co-cultivo con macrófagos condicionados.

De igual forma, también se evaluó el posible efecto que pudiera causar la presencia de células MCF-7 sobre la producción de citocinas en los macrófagos producto de la

interacción entre ambos tipos de células. Se puede apreciar que ante el estímulo con  $TNF-\alpha$  el nivel de transcripto de los genes *IL-6*, *IL-8*, *Rantes* y *TNF-\alpha* se incrementó claramente debido a la presencia de las células MCF-7 con respecto a los macrófagos solos. A diferencia de los genes antes mencionados, *MCP-1* no mostró un aumento significativo producto de la presencia de las células MCF-7 (Fig. 21d).



**Figura 21: La interacción entre células MCF-7 y macrófagos condicionados produce sobre-expresión de *IL-6* y *Rantes* mediante el estímulo con  $TNF-\alpha$  en ambos tipos de células.**

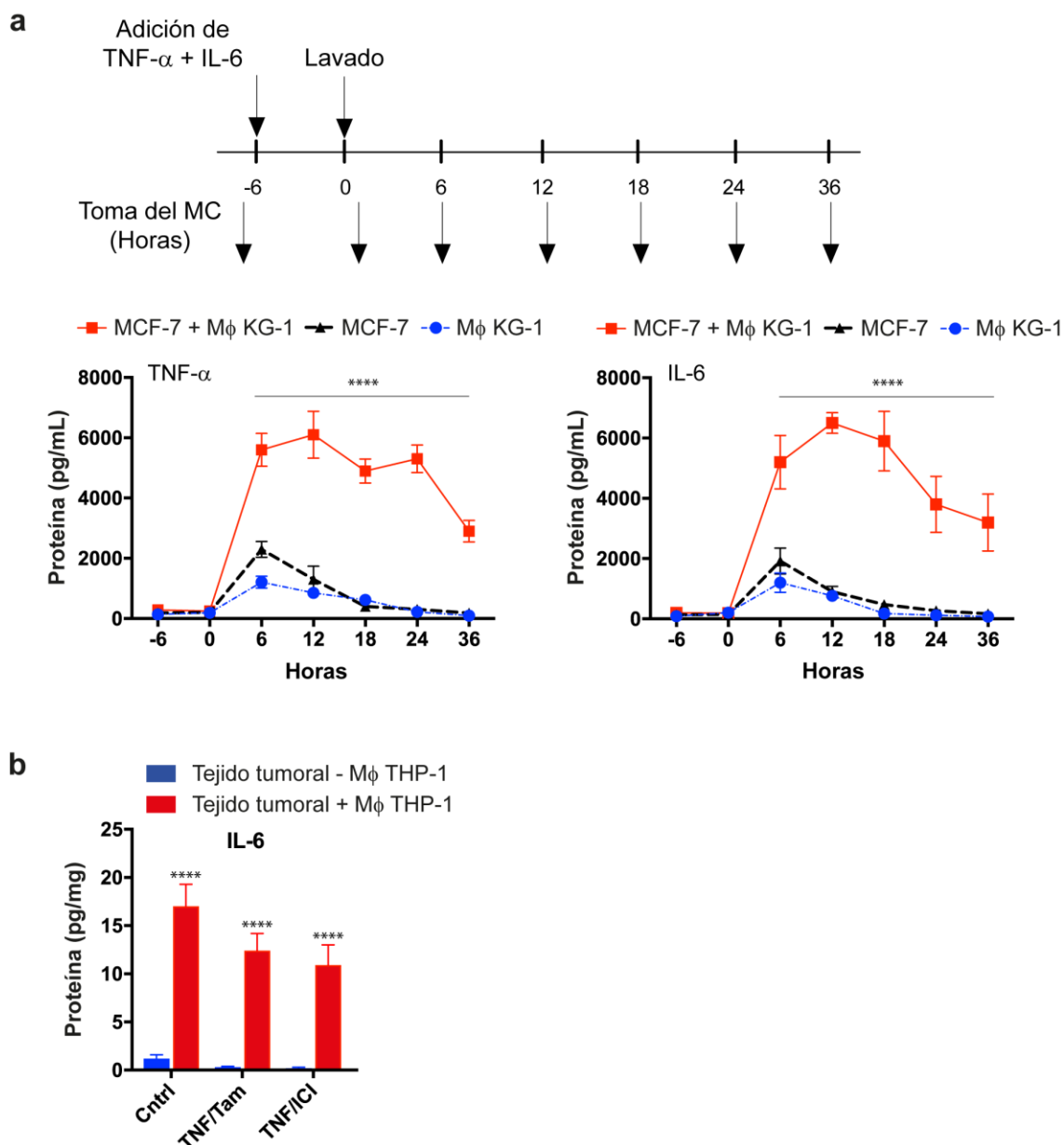
Expresión de los genes *IL-6* (a), *Rantes* (CCL5) (b) y *MCP-1* (c) en células MCF-7 cultivadas solas o en presencia de macrófagos KG-1 condicionados separados por una membrana semipermeable (poro 0,4  $\mu m$ ). Las células fueron tratadas por 2 h con los compuestos indicados. **Cntrl:** DMEM sin rojo fenol, **TNF:**  $TNF-\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu M$ , **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu M$ . (d) Macrófagos KG-1 condicionados fueron cultivados con o sin células MCF-7 separados por una membrana semipermeable (poro 0,4  $\mu m$ ). Luego de 2 h. de tratamiento con  $TNF-\alpha$  (1 ng/mL) se analizó la expresión de los genes indicados. En todos los casos se cuantificó por RT-qPCR el nivel relativo de mRNA de cada gen con respecto al control sin macrófagos calculando el resultado por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se utilizó como control interno la expresión del gen 18S. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl, mismo color) (Δ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . NSS = No hay diferencia significativa.

En base al análisis hecho a partir del “array” de anticuerpos para detectar diferentes factores solubles como citocinas y quimiocinas (ver Fig. 20), se observa que varias proteínas proinflamatorias fueron incrementadas en el medio de cultivo de células MCF-7 y macrófagos condicionados. Entre éstas, la IL-6 es la citocina que lo hizo en mayor medida. Por otra parte, TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de IL-6 a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y ya se demostró la importancia de TNF- $\alpha$  en nuestro modelo como inductor de proliferación, migración y resistencia endócrina en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados. Además, IL-6 vía su propio receptor es capaz de activar el factor de transcripción STAT3, el cual se ha visto que tiene la capacidad de autorregularse en muchos tipos de células [143].

Con el fin de determinar si IL-6 y TNF- $\alpha$  eran capaces de inducir su propia expresión se analizó los niveles de estas citocinas a lo largo del tiempo en el medio de cultivo de células MCF-7, macrófagos condicionados y en el co-cultivo de ambas líneas celulares a lo largo de 36 h de cultivo (ver protocolo Fig. 22a). Brevemente, las células crecidas a una confluencia aproximada del 80 %, recibieron un estímulo inicial de TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) e IL-6 (100 pg/mL) durante 6 horas. Luego se les cambió el medio de cultivo por DMEM sin rojo fenol ni factores (previo lavado con PBS) y se cultivaron por 36 horas. Cada 6 horas se tomaron muestras del medio de cultivo que posteriormente fueron analizadas por ensayo de ELISA.

Se puede distinguir que los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el medio de cultivo de células MCF-7 junto con macrófagos son claramente mayores a los niveles medidos en el medio de cultivo de células MCF-7 y macrófagos individuales ( $P \leq 0,0001$  en ambos casos) (Fig. 22a). Lo notable es que la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el co-cultivo de células MCF-7 y macrófagos se mantuvo de forma sostenida durante las primeras 24 h producto de la interacción entre ambos tipos de células. Mientras tanto, en los cultivos individuales se detecta un aumento inicial que responde al estímulo de TNF- $\alpha$ /IL-6 del comienzo, el cual decae prácticamente a cero en el transcurso de 24 horas. Un dato de los experimentos *in vivo* que concuerda con estos resultados es que el nivel intratumoral de IL-6 encontrado en los animales inyectados con la mezcla de células MCF-7 y macrófagos fue mayor al de los animales inyectados sólo con células MCF-7 (Fig. 22b).

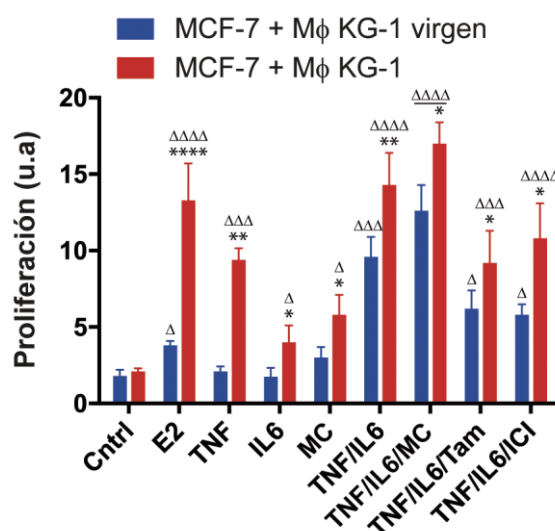




**Figura 22: IL-6 y TNF- $\alpha$  incrementan en el medio del co-cultivo de células MCF-7 y macrófagos KG-1 condicionados lo cual se correlaciona con el nivel de IL-6 en tumores de xenoinjerto de células MCF-7 y macrófago THP-1.**

(a) En la parte superior se observa una línea de tiempo con detalles del tratamiento que recibieron las células MCF-7 y macrófagos. El medio condicionado (MC) de los cultivos celulares fue colectado cada 6 h (flechas inferiores) durante 36 h, y luego analizado por ELISA para medir la expresión de TNF- $\alpha$  (gráfico izquierdo) y IL-6 (gráfico derecho) a los distintos tiempos. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM) expresado como pico gramos de proteína por mL de medio (pg/mL). \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$  (b) Expresión de la proteína IL-6 en tumores de xenoinjerto de células MCF-7 crecidos con o sin macrófagos THP-1 condicionados durante 30 días. La concentración de IL-6 se cuantificó por ELISA y se expresa en pico gramos de proteína por miligramo de tejido de tumor total (pg/mg) (n=6). \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ .

Por todo esto se hipotetiza que IL-6 junto con TNF- $\alpha$  podría ser uno de los factores claves en la inducción de la resistencia endócrina en las células MCF-7 mediada por macrófagos. En este sentido se midió la proliferación de células MCF-7 tratadas con estas dos citocinas al ser cultivadas junto con macrófagos KG-1 condicionados o sin condicionar (vírgenes, *naïve*). El estímulo con TNF- $\alpha$  o IL-6 de forma individual no indujo proliferación en presencia de los macrófagos vírgenes (Fig. 23). Por su parte, cuando los macrófagos fueron previamente condicionados, las células MCF-7 proliferaron ante el estímulo de TNF- $\alpha$  como se esperaba ( $P \leq 0,001$ ). IL-6 también indujo proliferación en esta condición, pero a tasas considerablemente menores ( $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, el tratamiento con TNF- $\alpha$ /IL-6 de forma combinada sorpresivamente indujo proliferación en las células MCF-7 en presencia de macrófagos vírgenes ( $P \leq 0,001$ ) e incluso también fue capaz de hacerlo ante el tratamiento con tamoxifeno o ICI ( $P \leq 0,05$  en ambos casos). Estos resultados indican que TNF- $\alpha$  e IL-6 son muy necesarios en este complejo fenómeno por el cual las células de cáncer de mama son inducidas a proliferar de manera independiente a estradiol.



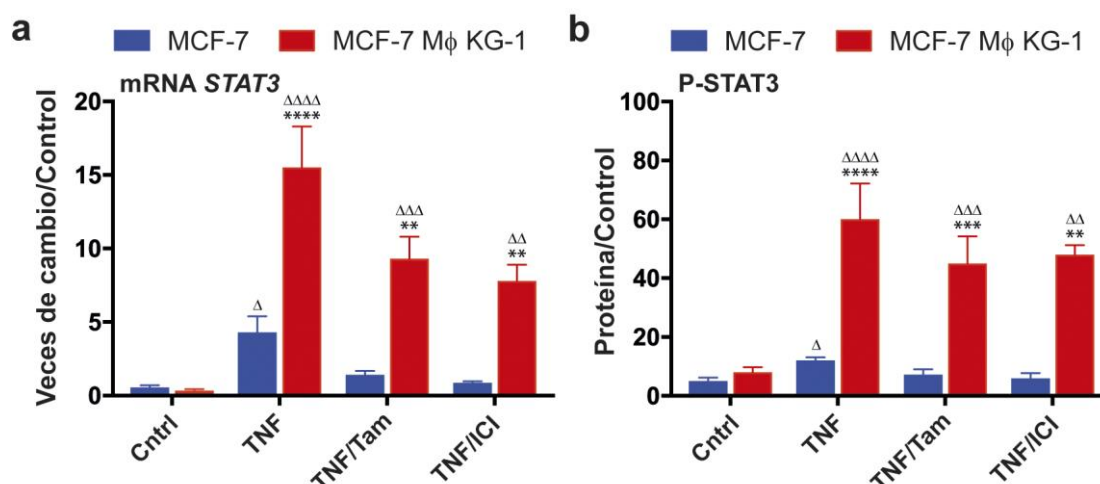
**Figura 23: El estímulo combinado de TNF- $\alpha$  e IL-6 induce proliferación en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos no condicionados.**

Proliferación de células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos KG-1 vírgenes o condicionados separados por membrana semipermeable (poro 0,4  $\mu$ m) y tratados con los compuestos que se indican. La proliferación se cuantificó tras 48 h. de cultivo mediante concentración de ADN por CyQuant. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar expresado en unidades arbitrarias (u.a.). **Cntrl:** DMEM sin rojo fenol, **E2:** Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF:** TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **IL-6:** IL-6 1 ng/mL, **MC:** medio condicionado 10% **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento con macrófagos vírgenes (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

Dado el rol establecido para la vía de IL-6/STAT3 en promover el crecimiento tumoral [84], se evaluó su importancia en la proliferación de las células de cáncer de mama inducida por los macrófagos condicionados. Por ello se analizó la expresión de STAT3 en células MCF-7 cultivadas solas o junto con macrófagos KG-1 condicionados tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína en su estado activo, es decir fosforilada. El tratamiento con TNF- $\alpha$  por dos horas indujo la expresión génica de *STAT3* en células MCF-7 solas ( $P \leq 0,05$ ), la cual pudo ser bloqueada por tamoxifeno o ICI 182,780 (Fig. 24a barras azules). Por otro lado, los macrófagos produjeron un significativo aumento de la expresión de *STAT3* en las células MCF-7 ante el mismo estímulo ( $P \leq 0,0001$ ) y esta vez el tratamiento con tamoxifeno y ICI 182,780 no fueron capaces de inhibir la expresión de dicho gen ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente) (barras rojas).

Por ensayos de ELISA se observó que la variación de los niveles de STAT3 fosforilado se correlacionan con los valores del mRNA de *STAT3* (Fig. 24b). El tratamiento con TNF- $\alpha$  produjo un leve incremento, aunque significativo, en el nivel de p-STAT3 en las células MCF-7 solas ( $P \leq 0,05$ ) (barras azules) y dicho incremento fue varias veces mayor producto del co-cultivo con macrófagos condicionados ( $P \leq 0,0001$ ) (barras rojas). Nuevamente, el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 tuvo efecto sobre las células MCF-7 solas ya que evitó la activación de STAT3 pero no redujo de manera significativa el nivel de p-STAT3 ante la presencia de los macrófagos condicionados ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente).

En resumen, se observa que la presencia de macrófagos condicionados provoca que el estímulo con TNF- $\alpha$  produzca un significativo incremento en los niveles del mRNA de *STAT3* y de p-STAT3 en las células MCF-7. El tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no logra bloquear el efecto de los macrófagos mediado por TNF- $\alpha$  sobre la activación de STAT3 aunque si se observa una reducción parcial en el nivel del mRNA y de la proteína fosforilada.

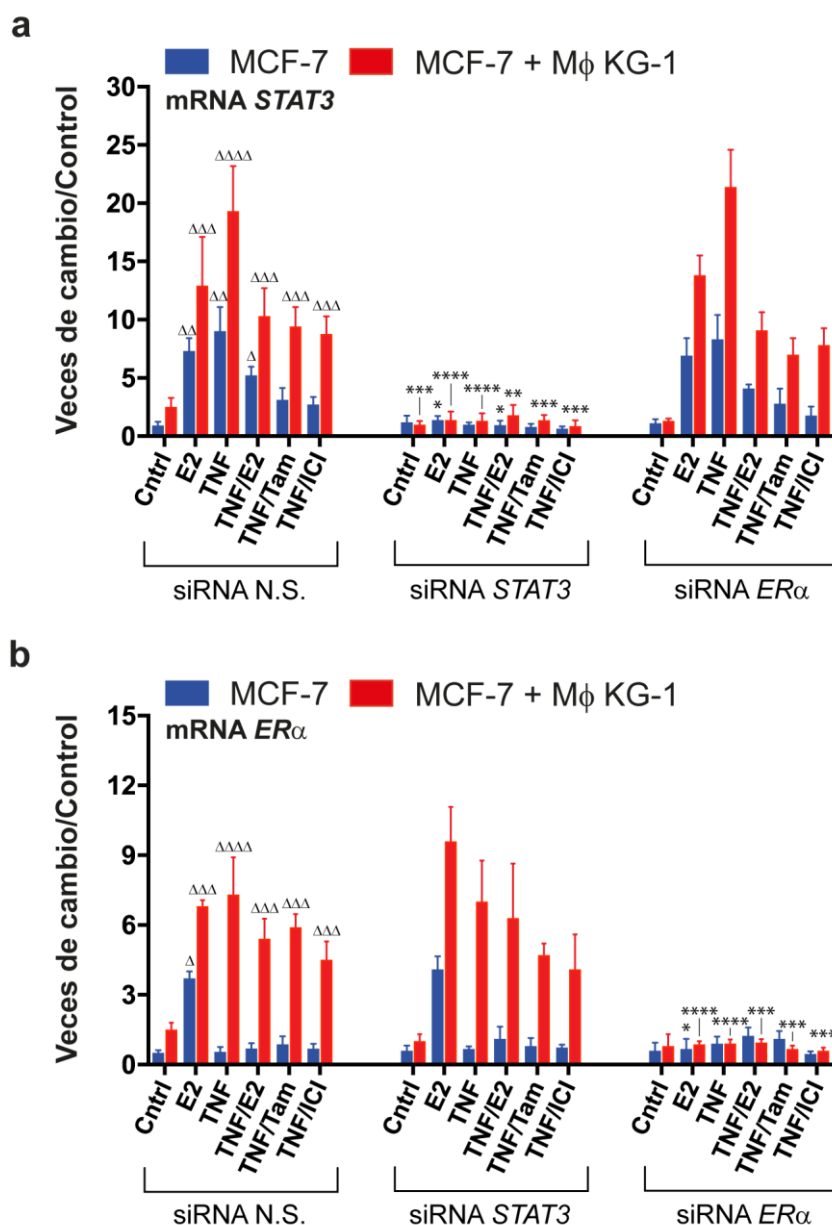


**Figura 24: Macrófagos KG-1 condicionados inducen un aumento en la expresión del mRNA de *STAT3* y la fosforilación de *STAT3* en células MCF-7 mediante el estímulo con *TNF-α*.**

(a) Expresión del mRNA que codifica para *STAT3* de células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados. Previo al análisis las células fueron tratadas con los compuestos que se indican durante 2 h. **Cntrl:** DMEM sin rojo fenol, **TNF:** *TNF-α* 1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI:** ICI 182,780. El nivel relativo de mRNA se cuantificó por RT-qPCR con respecto al control sin macrófagos calculando el resultado mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se utilizó como control interno la expresión del gen de beta actina. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. (b) Expresión de la proteína *STAT3* fosforilada en células MCF-7 cultivadas solas o en presencia de macrófagos KG-1 condicionados y tratados con los compuestos indicados por 2 h. Se cuantificó por el método de ELISA y se expresa la concentración relativa con respecto al control. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

El hecho de que el tratamiento con inhibidores del ER afecte de alguna forma el nivel de expresión y activación de *STAT3* mediado por *TNF-α* podría implicar alguna especie de interacción con la vía del *ERα*. Para averiguar esto, células MCF-7 fueron tratadas con siRNA contra el *ERα* o control (siRNA N.S.) por 48 h. Luego se analizó el nivel de expresión del mRNA de *STAT3* en las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados ante el estímulo de estradiol y/o *TNF-α*, *TNF-α*/tamoxifeno y *TNF-α*/ICI 182,780. Llamativamente, no se observó ninguna diferencia en los niveles del mRNA de *STAT3* entre las células MCF-7 tratadas con el siRNA contra el *ERα* y las células control (Fig. 25a). Esto indica que el efecto en la disminución parcial del mRNA de *STAT3* causado por el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 es totalmente independiente del *ERα*. Para confirmar de que no hay ninguna relación entre la expresión de *STAT3* y *ERα*, al menos en este contexto planteado, se realizó un experimento similar al anterior. En este caso las células MCF-7

fueron tratadas con siRNA contra *STAT3* o siRNA N.S. control. Luego se analizó la expresión del mRNA de *ERα* en las células MCF-7 solas o en presencia de macrófagos KG-1 condicionados ante el estímulo de estradiol y/o TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ /tamoxifeno y TNF- $\alpha$ /ICI 182,780. Nuevamente no se observaron diferencias significativas entre las células MCF-7 tratadas con el siRNA anti *STAT3* o el siRNA control en cuanto a los niveles de expresión de *ERα* (Fig. 25b).



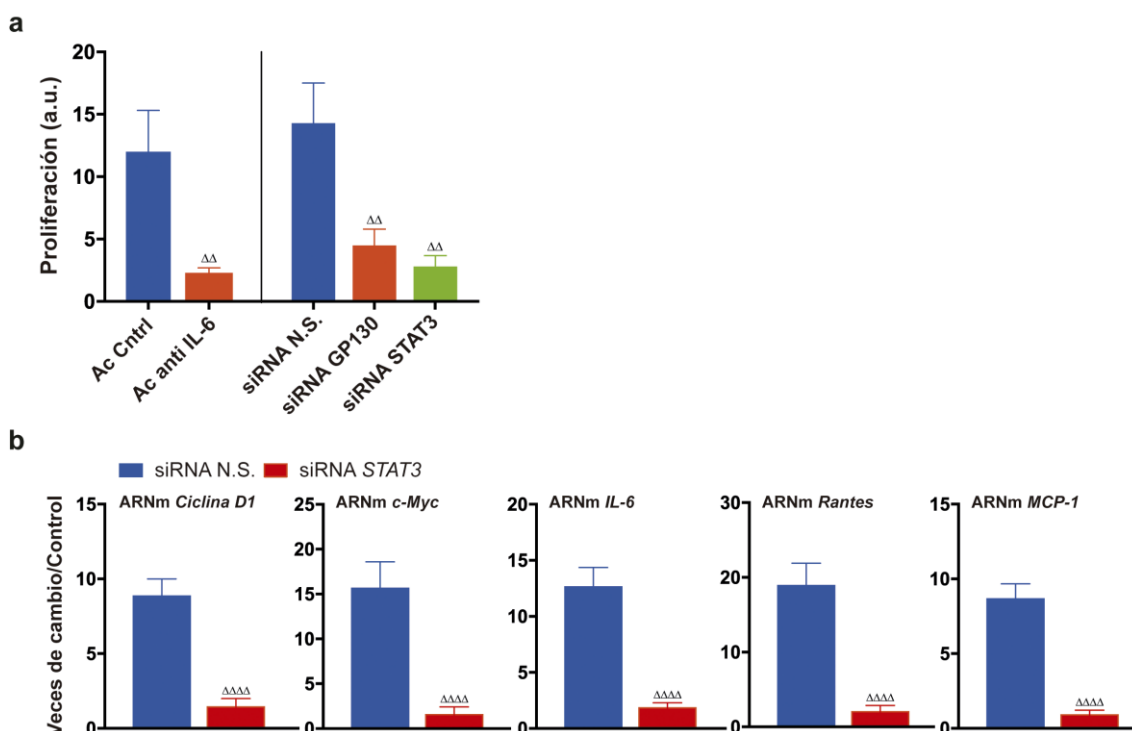
**Figura 25: No se observa disminución en la expresión de *STAT3* o *ERα* cuando las células MCF-7 son transfectadas con siRNA específico para *ERα* o *STAT3* respectivamente.**

Nivel del mRNA que codifica para las proteínas *STAT3* (a) o *ERα* (b) en células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de macrófagos KG-1 condicionados separados por una membrana semipermeable luego de 2 h de estímulo con los compuestos especificados. Las células MCF-7 fueron previamente tratadas con siRNA contra *ERα*, *STAT3* o con siRNA control

no silenciante (N.S.) por 48 h. Se cuantificó por RT-qPCR el nivel relativo de mRNA con respecto a su control (células sin estimular) calculando el resultado mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Se utilizó como control interno la expresión del gen de beta actina. **Cntrl:** DMEM sin rojo fenol, **E2:** Estradiol 1 $\mu$ M, **TNF:** TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam:** Tamoxifeno 1 $\mu$ M **ICI:** ICI 182,780 1  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento siRNA N.S. (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

Para confirmar la importancia de la vía de IL-6/STAT3 sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por los macrófagos condicionados se realizaron ensayos de inhibición de dicha vía a nivel del receptor de IL-6 o bloqueando la expresión de *STAT3* (Fig. 26a). Para ello las células MCF-7 fueron tratadas con un anticuerpo bloqueante del receptor de IL-6 o con un siRNA que inhibe la expresión de la subunidad *gp130* de dicho receptor. Ambos tratamientos lograron reducir la proliferación de las células MCF-7 de forma significativa ( $P \leq 0,01$  en ambos casos) (Fig. 26a). El mismo resultado se obtuvo al transfectar las células MCF-7 con un siRNA que bloquea la expresión de *STAT3* ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 26a).

Además, se evaluó la influencia de la vía IL-6/STAT3 sobre la expresión de otros genes claves como *ciclina D1*, *c-Myc*, *IL-6*, *Rantes* y *MCP-1* al inhibir la expresión de *STAT3* por siRNA en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados (Fig. 26b). Los resultados mostraron que ante el estímulo con TNF- $\alpha$  hay una clara reducción en la expresión de todos los genes evaluados en las células MCF-7 si se compara con los niveles de expresión alcanzados por estas mismas células tratadas con siRNA sin sentido ( $P \leq 0,0001$ ).



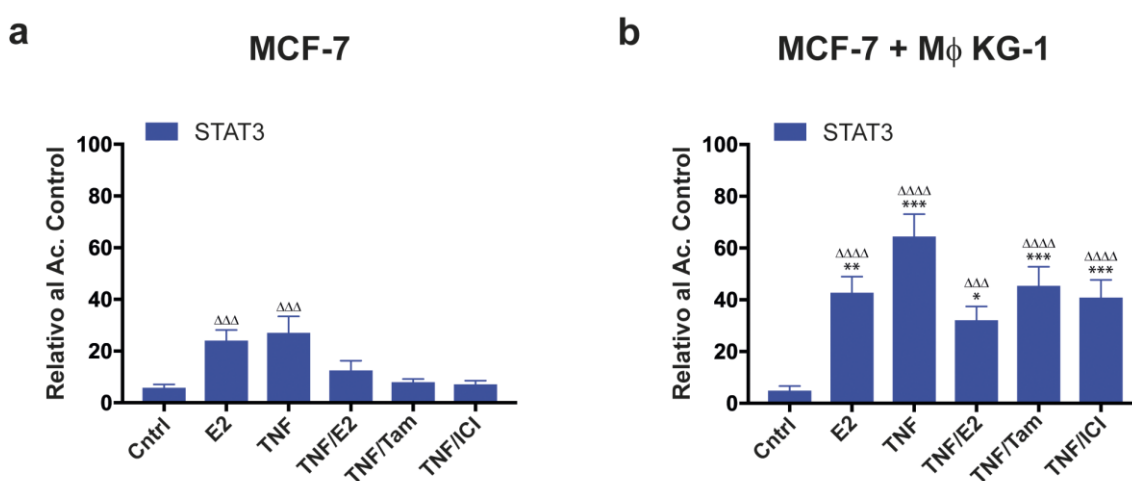
**Figura 26: La vía de IL-6/STAT3 es esencial en la proliferación de las células MCF-7 inducida por TNF $\alpha$ /IL-6 en presencia de macrófagos condicionados.**

(a) Nivel de proliferación expresado en unidades arbitrarias (u.a.) de células MCF-7 cultivadas con macrófagos condicionados bajo el estímulo de TNF- $\alpha$ /IL-6 (1 ng/mL). Las células MCF-7 fueron previamente tratadas por 4 h. con anticuerpo anti receptor de IL-6 o siRNA contra STAT3 o GP130 según se indica. Un anticuerpo IgG no específico (Ac. Cntrl) y un siRNA no silenciante (N.S.) fueron utilizados como controles respectivos. La proliferación se midió luego de 48 h de cultivo por CyQuant. (b) Se muestran (de izquierda a derecha) el nivel de expresión del mRNA de ciclina D1, c-Myc, IL-6, Rantes (CCL-5) y MCP-1 en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados y estimuladas por 2 h con TNF- $\alpha$ /IL-6 (1 ng/mL). Las células MCF-7 48 h antes fueron transfectadas con un siRNA anti STAT3 o un siRNA N.S. En todos los casos se cuantificó por RT-qPCR el nivel relativo de mRNA de cada gen con respecto al control (células tratadas con siRNA N.S. sin estimular) calculando el resultado por el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se utilizó como control interno la expresión del gen 18S. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto al tratamiento con siRNA N.S. o Ac. Cntrl ( $\Delta$ ). 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

Todo esto establece a STAT3 como otro factor de transcripción clave en la desregulación génica inducida por los macrófagos condicionados en células de cáncer de mama ER $\alpha$ +. Por ello, también se estudió el estado de asociación del factor de transcripción STAT3 sobre el promotor del gen *ciclina D1* en células MCF-7 cultivadas solas o junto con macrófagos KG-1 condicionados. Mediante ensayo de ChIP se observó que STAT3 se asocia al promotor de *ciclina D1* ante el estímulo con estradiol o TNF- $\alpha$  en células MCF-7 cultivadas en ausencia de macrófagos ( $P \leq 0,001$ ). El tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 a su vez provocó que la interacción de

STAT3 con dicho promotor inducida por el estímulo con TNF- $\alpha$  no sea significativamente diferente del control (Fig. 27a).

Por su parte en las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados se observó un incremento en el nivel de asociación de STAT3 al promotor de *ciclina D1* ante el estímulo con estradiol en comparación con las células MCF-7 solas ante el mismo estímulo ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 27b). De modo similar, al tratar las células MCF-7 con TNF- $\alpha$  aumenta el reclutamiento de STAT3 debido a la presencia de los macrófagos ( $P \leq 0,001$ ). En esta ocasión el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no pudo bloquear la asociación de STAT3 al promotor de *ciclina D1* inducida por TNF- $\alpha$ . ( $P \leq 0,001$ ).



**Figura 27: Macrófagos condicionados inducen un aumento en el reclutamiento de STAT3 en el promotor del gen *ciclina D1* en células MCF-7.**

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de las proteínas Stat3 seguido de cuantificación por RT-qPCR del promotor de *ciclina D1*. Las células MCF-7 fueron cultivadas solas (**a**) o con macrófagos KG-1 condicionados (**b**) por 24 h. Luego se realizó un estímulo de 2 h con los compuestos que se especifican. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar de la media (SEM). **Cntrl**: DMEM sin rojo fenol ni el agregado de factores adicionales, **E2**: Estradiol 1  $\mu$ M, **TNF**: TNF- $\alpha$  1 ng/mL, **Tam**: Tamoxifeno 1  $\mu$ M, **ICI**: ICI 182,780 1  $\mu$ M. **Ac. control**: Anticuerpo control (IgG). Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) ( $\Delta$ ) o con respecto al mismo tratamiento sin macrófagos (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ . NSS = No hay diferencia significativa.

Finalmente se estudió la relación que existe entre la vía de IL-6/STAT3 y el estado de activación del ER $\alpha$  en la proliferación mediada por los macrófagos condicionados. Como ya se mostró anteriormente, el tratamiento de las células MCF-7 con TNF- $\alpha$ /IL-6 llamativamente es capaz de inducir proliferación independiente de estradiol (Fig. 23 y 26a) por medio de la activación del ER $\alpha$  (Fig. 15), el cual mostró ser fosforilado en su

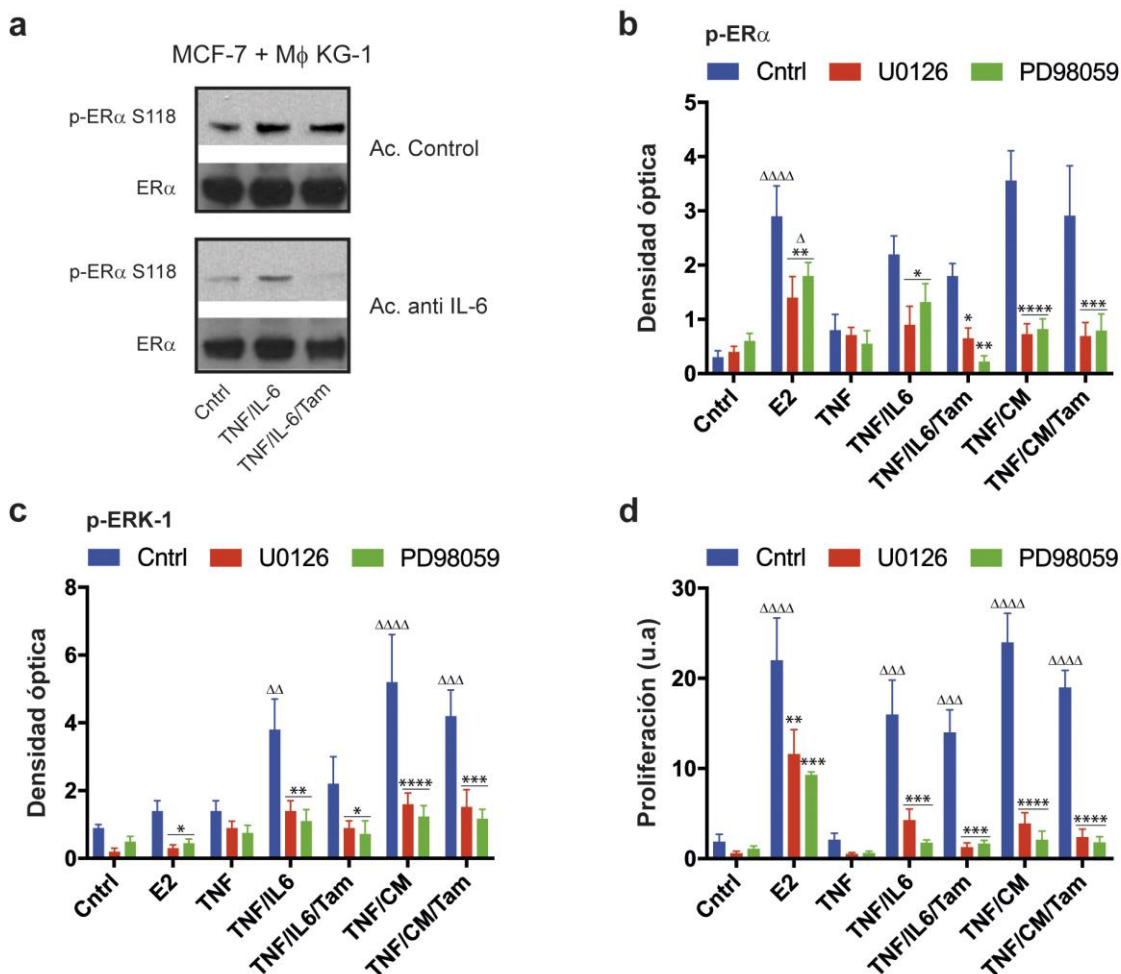


serina 118 de una manera dependiente de NF- $\kappa$ B (Fig. 19c). Por este motivo se decidió analizar si el receptor de IL-6 podría estar cumpliendo un rol importante en la fosforilación del ER $\alpha$  en la serina 118. Para ello, células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos KG-1 condicionados fueron tratadas con anticuerpos contra el receptor de IL-6 o un anticuerpo control IgG. Luego las células recibieron un estímulo de 2 horas con medio solo (control), TNF- $\alpha$ /IL-6 o TNF- $\alpha$ /IL-6/Tamoxifeno (Fig. 28a). Por Western Blot se observa que el anticuerpo anti IL-6 es capaz de reducir significativamente el aumento de p-ER $\alpha$  S118 en las células MCF-7 inducido por el estímulo de TNF- $\alpha$ /IL-6 en presencia de macrófagos condicionados. Además, en estas condiciones el tratamiento con tamoxifeno redujo el nivel de p-ER $\alpha$  S118 a los niveles basales, igual al control sin estimular.

A los fines de analizar qué quinasas participan en la fosforilación del ER $\alpha$  en la S118 en este contexto independiente de ligando, se utilizaron dos inhibidores diferentes de la quinasas ERK-1 (U0126 y PD98059). Los resultados indican que al inhibir la quinasas ERK-1 en células MCF-7 se reduce significativamente el nivel de fosforilación en la serina 118 del ER $\alpha$  inducido por el estímulo de TNF- $\alpha$ /IL-6 en presencia de macrófagos condicionados ( $P \leq 0,05$ ). Esto indicaría que ERK-1 sería una de las quinasas responsables de la activación independiente de ligando de ER $\alpha$  (Fig. 28b). Además, es importante notar que el estímulo con TNF- $\alpha$ /IL-6 incrementa significativamente el nivel de la quinasas ERK-1 fosforilada (activa) ( $P \leq 0,01$ ) y que el incremento producido por el estímulo con estradiol, el cual induce proliferación en las células MCF-7 de manera canónica, no fue significativo con respecto al control (Fig. 28c).

Analizando la proliferación de las células MCF-7 en presencia de macrófagos condicionados, bajo el tratamiento con los inhibidores U0126 y PD98059, se observa que ERK-1 cumple un papel muy importante en la proliferación alternativa independiente de estradiol inducida por TNF- $\alpha$ /IL-6. La proliferación de las células MCF-7 inducida por el estímulo de TNF- $\alpha$ /IL-6 disminuyó significativamente al inhibir ERK-1 ( $P \leq 0,001$ ). Además, la proliferación de las células MCF-7 en estas condiciones no es significativamente diferente a las de las células control sin estimular. Por otro lado, las células MCF-7 mostraron una reducción significativa en la proliferación inducida por estradiol producto del tratamiento con U0126 y PD98059 ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$  respectivamente). Sin embargo, estos valores de proliferación son significativamente superiores a los de las células MCF-7 control sin estimular ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$  respectivamente) denotando que los inhibidores de ERK-1 solo

producen una reducción parcial en la proliferación mediada por estradiol (Fig. 28d).



**Figura 28: La fosforilación del ERα independiente de estradiol en células MCF-7 mediada por el estímulo de TNF-α/IL-6 depende de la quinasa ERK-1.**

(a) Western Blot de homogenato total de células MCF-7 cultivadas con macrófagos condicionados revelado con anticuerpos anti ERα total o anti ERα fosforilado en S118 (p-ERα S118). Las células fueron sincronizadas por 48 horas, luego tratadas con anticuerpo anti receptor de IL-6 o con anticuerpo control (IgG no específico) por 2 h y finalmente 2 h antes de ser cosechadas fueron estimuladas con los compuestos especificados en la figura. En (b) y (c) se muestra el nivel de expresión de las proteínas p-ERα S118 y ERK-1 fosforilada (p-ERK-1) en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos KG-1 condicionados luego de 2 h de estímulo con los compuestos indicados. Dos horas antes de ser estimuladas las células fueron tratadas con inhibidores específicos de ERK-1 (U0126 y PD98059) o solo se agregó DMEM (barras azules). (d) Proliferación expresada en unidades arbitrarias (u.a) de células MCF-7 luego de 48 h de cultivo medido por CyQuant. Las células fueron tratadas con inhibidores de ERK-1 (barras rojas y verdes) y con los compuestos que se especifican. En (b) (c) y (d) se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Las diferencias estadísticas se expresan con respecto a su propio control (Cntrl) (Δ) o con respecto al mismo tratamiento sin inhibidores de ERK-1 (\*). 1 símbolo  $P \leq 0,05$ ; 2 símbolos  $P \leq 0,01$ ; 3 símbolos  $P \leq 0,001$ ; 4 símbolos  $P \leq 0,0001$ .

## Discusión

Uno de los principales tratamientos utilizados en pacientes con tumores de mama ER+ es la terapia adyuvante con tamoxifeno, el cual ha demostrado mejorar la sobrevida de las pacientes y reducir la recurrencia de la enfermedad [144]. Sin embargo, una proporción considerable de pacientes que inicialmente responden favorablemente al tratamiento con tamoxifeno posteriormente adquieren resistencia [145]. Una gran cantidad de estudios han reportado diferentes mecanismos de resistencia al tratamiento con tamoxifeno. Algunos de estos mecanismos incluyen cambios en la expresión y/o modificaciones postraduccionales del ER, alteraciones en las proteínas correguladoras, incremento en la actividad AP-1 y desregulación del ciclo celular [146-150]. Además, las evidencias reportadas hasta el momento sugieren que muchos de los mecanismos de resistencia al tratamiento con tamoxifeno involucran un incremento en la señalización de receptores tirosina quinasa como son el EGFR, HER-2 e IGF-1R, los cuales conducen a la activación de las vías de ERK y PI3K [145].

La línea celular de mama MCF-7 es positiva para el receptor de estrógenos alpha (ER $\alpha$ +) y se caracteriza por responder al tratamiento con SERMs y antagonistas puros de dicho receptor. En este trabajo de tesis se ha descrito un posible mecanismo por el cual células MCF-7 proliferan ante el estímulo de TNF- $\alpha$  cuando se encuentran comunicados de forma paracrina con macrófagos condicionados, exhibiendo resistencia al tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780. Como se introdujo previamente, los macrófagos son células muy plásticas que poseen la capacidad de activar diferentes programas funcionales dependiendo de las señales que reciban de su entorno. Diferentes poblaciones de TAMs pueden coexistir en un tumor dependiendo de las variaciones en el micro-medioambiente [44]. En general los TAMs poseen un perfil similar al de un macrófago M2 o alternativo, los cuales están involucrados en el proceso de cicatrización de heridas y crecimiento de tejido. En muchos casos los TAMs poseen expresión constitutiva alta de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  [151]. Desde el punto de vista del micro-medioambiente, un tumor es considerado una herida que nunca sana [14]. Estudios clínicos sugieren que altos niveles de TAMs infiltrados en tumores de mama se correlacionan con un peor pronóstico [152]. Han sido reportadas diferentes contribuciones de los TAMs en el micro-medioambiente tumoral que promueven el desarrollo y la evolución del cáncer. Los TAMs pueden favorecer el crecimiento de las células tumorales, la remodelación de la matriz extracelular, la invasión del tejido

circundante y la formación de metástasis así como la inmunosupresión local [47]. Por el contrario muy pocos reportes han relacionado a los TAMs con el desarrollo de resistencia endócrina [153, 154].

Analizando el modelo experimental *in vitro* empleado, donde células MCF-7 y macrófagos condicionados interaccionan separados por una membrana semipermeable de forma paracrina, se observa que dicha interacción induce la liberación al medio de cultivo de TNF- $\alpha$  e IL-6 a niveles significativamente superiores con respecto a los cultivos individuales (Fig. 22). Además, dicha diferencia en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 se mantuvo a lo largo de 36 horas. En base a que los niveles del mRNA de *IL-6* se incrementan en ambas líneas celulares del co-cultivo con respecto a los cultivos individuales (Fig. 21), es posible hipotetizar que la IL-6 secretada al medio de cultivo provendría tanto de los macrófagos como de las células MCF-7. El resultado de la figura 22 muestra que el co-cultivo de las células MCF-7 y los macrófagos condicionados favorece la formación de un micro-medioambiente proinflamatorio. TNF- $\alpha$  e IL-6 vía sus propios receptores producen la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 respectivamente, los cuales junto con c-Myc han sido relacionados con la polarización de los macrófagos hacia un perfil tipo M2, dicho perfil de activación concuerda con una actividad protumoral [155-157]. Mientras que la literatura en el pasado ha equiparado a los TAMs con un fenotipo M2 puro, se ha vuelto cada vez más claro que los TAMs se componen de múltiples poblaciones distintas con características superpuestas que dependen de una variedad de factores que incluyen la ubicación en el micro-medioambiente, el estadio del tumor y tipo de cáncer [158]. La importancia del estímulo simultáneo con TNF- $\alpha$  e IL-6 se puso en evidencia en el hecho de que el tratamiento de células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos vírgenes proliferaron ante dicho estímulo, mientras que los estímulos con TNF- $\alpha$  o IL-6 de forma individual no fueron capaces de inducir proliferación en estas condiciones donde los macrófagos no fueron condicionados (Fig. 23).

Los resultados de las figuras (Figs. 15, 18b y 26a) muestran que la proliferación de las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados, estimuladas con TNF- $\alpha$  y bajo el tratamiento de tamoxifeno o ICI 182,780, depende de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, STAT3 y ER- $\alpha$ . En diferentes reportes NF- $\kappa$ B ha sido asociado con resistencia endócrina principalmente modulando la actividad del ER $\alpha$ . Un mecanismo de acción posible de NF- $\kappa$ B es reprimiendo la expresión del ER $\alpha$  lo cual permitiría que surja una población de células resistente al tamoxifeno producto de dicha

presión selectiva. Este mecanismo de acción no podría estar sucediendo en este caso debido a que la presencia del ER $\alpha$  es necesaria para que las células MCF-7 proliferen. Otra forma posible de resistencia endócrina mediada por NF-kB podría deberse a la baja en la activación del ER $\alpha$  producida por el tratamiento con SERMs la cual favorece la activación de otras vías de proliferación dirigidas por NF-kB que surgen como mecanismos compensatorios [159]. Por otro lado, se sabe que el estradiol es capaz de suprimir la expresión de genes que responden a NF-kB en células de cáncer de mama [133]. En este sentido, los tumores de mama ER- han sido asociados con una elevada actividad de NF-kB [134, 135, 160] y con una mayor expresión de IL-6, IL-8, Rantes y MCP-1 [136, 137]. Esto concuerda con el hecho de que los antagonistas del ER $\alpha$  como los inhibidores de aromatasas produzcan el efecto contrario, es decir que al suprimir la acción del estradiol se incrementa la expresión de los genes que responden a NF-kB [133, 161].

Un aspecto importante de todo este proceso por el cual las células MCF-7 desarrollan resistencia endócrina mediada por los macrófagos condicionados es la fosforilación independiente de ligando del ER $\alpha$  que vuelve a dicho factor de transcripción constitutivamente activo. La fosforilación independiente de ligando del ER $\alpha$  es uno de los principales mecanismos de resistencia endócrina descriptos. Varias cascadas de quinasas como PKA (*protein kinase A*), MAPK y PAK (*P21-activated kinase*) han sido asociadas con resistencia a tamoxifeno, estas quinasas inducen la fosforilación del ER $\alpha$  o de sus corre reguladores [145]. Los residuos de serina S102, S104 y S106 en la región AF-1 del ER $\alpha$  son fosforilados por GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) y por las vías de ERK1/2 y MEK1/2 [162]. Además, la fosforilación en la serina 118 es uno de los sitios de fosforilación del ER $\alpha$  más reportados, el cual es blanco de las quinasas MAPK, GSK-3, IKK $\alpha$  y CDK7 (*cyclin dependent kinase 7*) [163]. Por otro parte STAT3 no ha sido relacionado directamente con la inducción de resistencia endócrina pero sí de forma indirecta a través de la activación de ciclina D1 y de las quinasas ERK1/2 y MEK1/2 [131, 162, 164].

Se pudo comprobar que las células MCF-7 que poseen el ER $\alpha$  con una mutación puntual en la serina 118 por una alanina no proliferan ante el estímulo de TNF- $\alpha$  cuando son co-cultivadas con macrófagos condicionados y tratadas con tamoxifeno o ICI 182,780 (Fig. 19d). Este resultado muestra que la fosforilación en la serina 118 del ER $\alpha$  es esencial en la proliferación de las células MCF-7 independiente de estradiol, pero no se descarta la posibilidad de que otros residuos del ER $\alpha$  estén siendo fosforilados en

dicho proceso. La quinasa ERK-1 estaría involucrada en la fosforilación del ER $\alpha$  en la serina 118, ya que dos inhibidores específicos de dicha quinasa (U0126 y PD98059) pudieron bloquear de forma significativa la fosforilación del ER $\alpha$  en dicho residuo y la subsecuente resistencia endócrina mediada por los macrófagos condicionados (Figs. 28b y 28d). La quinasa ERK-1 podría ser activada tanto por la vía de TNF- $\alpha$  como de IL-6, incluso también podría ser activada por IL-8, otra de las citocinas que se vieron incrementadas producto del co-cultivo con macrófagos (Fig. 20) [165]. En este sentido se ha reportado recientemente que células MCF-7 resistentes a tamoxifeno expresan niveles elevados de IL-8 [166]. Otro trabajo muestra que en células de cáncer de ovario IL-6 e IL-8 son capaces de activar genes que responden a estradiol y que existe una especie de regulación recíproca entre estas vías de señalización, lo cual concuerda con los hallazgos de este trabajo en células de cáncer de mama [167]. Algo que queda para analizar en un futuro es justamente la posible implicancia de IL-8 en este complejo fenómeno.

La resistencia endócrina inducida por los macrófagos condicionados también pudo ser comprobada en un modelo *in vivo*, en donde células MCF-7 fueron inyectadas en ratones inmunodeprimidos Nu/Nu junto con la línea celular de monocitos humanos THP-1 (Fig. 12). Las células MCF-7 normalmente no pueden crecer y formar tumores de xenoinjerto en modelos animales sin un nivel de estradiol sistémico adecuado. Por esta razón se necesita del suministro externo de estradiol que permita mantener los niveles correspondientes de dicha hormona para que las células MCF-7 puedan crecer. Sin embargo, las células MCF-7 inyectadas conjuntamente con los monocitos THP-1 lograron crecer en los ratones aun cuando el suministro de estradiol externo fue removido. Incluso el tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780 no fue capaz de disminuir el crecimiento de estos tumores.

Es importante aclarar que el micro-medioambiente tumoral se constituye por una población heterogénea de células compuesta por las células tumorales junto con las células del estroma que son reclutadas del entorno. El estroma tumoral es muy complejo y está formado principalmente por fibroblastos, células endoteliales y pericitos, adipocitos, macrófagos, linfocitos, MDSCs y otras células del SI [14]. Es la interacción entre todas las células de este enmarañado sistema la que determina la evolución de un tumor. Frente a este escenario tan complejo que involucra la interacción entre diferentes tipos celulares, el modelo de co-cultivo *in vitro* de células MCF-7 y macrófagos condicionados, empleado en este estudio, no deja de ser una simplificación que nos

permite estudiar el efecto puntual de los macrófagos sobre las células de cáncer de mama, pero que al mismo tiempo deja de lado las contribuciones de los demás tipos de células que componen el estroma tumoral. Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* representan un avance en este sentido ya que extrapola los resultados obtenidos *in vitro* a un contexto mucho más complejo. Sin embargo, no debe perderse de vista que este experimento fue realizado en ratones inmunodeprimidos Nu/Nu que carecen de linfocitos T, los cuales son un actor fundamental en la respuesta inmune adaptativa y en la modulación del micro-medioambiente tumoral [168, 169].

En base a los resultados de ChIP (Figs. 16 y 27) se observa que en las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados el estímulo con TNF- $\alpha$  induce la unión de p65, ER $\alpha$  y STAT3 al promotor de *ciclina D1*. Recordemos que en estas condiciones las células MCF-7 proliferan en ausencia de estradiol e incluso bajo el tratamiento con tamoxifeno (Fig. 8) y que la falta de alguno de estos tres factores de transcripción (Figs. 15, 18b y 26a) redujo significativamente la tasa de proliferación de las células MCF-7. Esto sugiere que p65, ER $\alpha$  y STAT3 podrían estar formando parte de un mismo complejo transcripcional no descartándose la posibilidad de que alguna otra proteína forme parte de dicho complejo. Teniendo en cuenta que la porción del promotor de *ciclina D1* amplificada posee un sitio de unión de NF-kB [170, 171], p65 estaría unido directamente al ADN pero la disposición que estarían adoptando ER $\alpha$  y STAT3 no es posible saberla con estos resultados. Se ha descrito que ER $\alpha$  al ser fosforilado de forma independiente de ligando en la serina 118 puede unirse indirectamente al ADN a través de factores de transcripción tipo AP-1, SP-1 o NF-kB [163, 172] por lo que se puede especular que en este caso ER $\alpha$  fosforilado en la serina 118 podría estar actuando como cofactor unido a NF-KB.

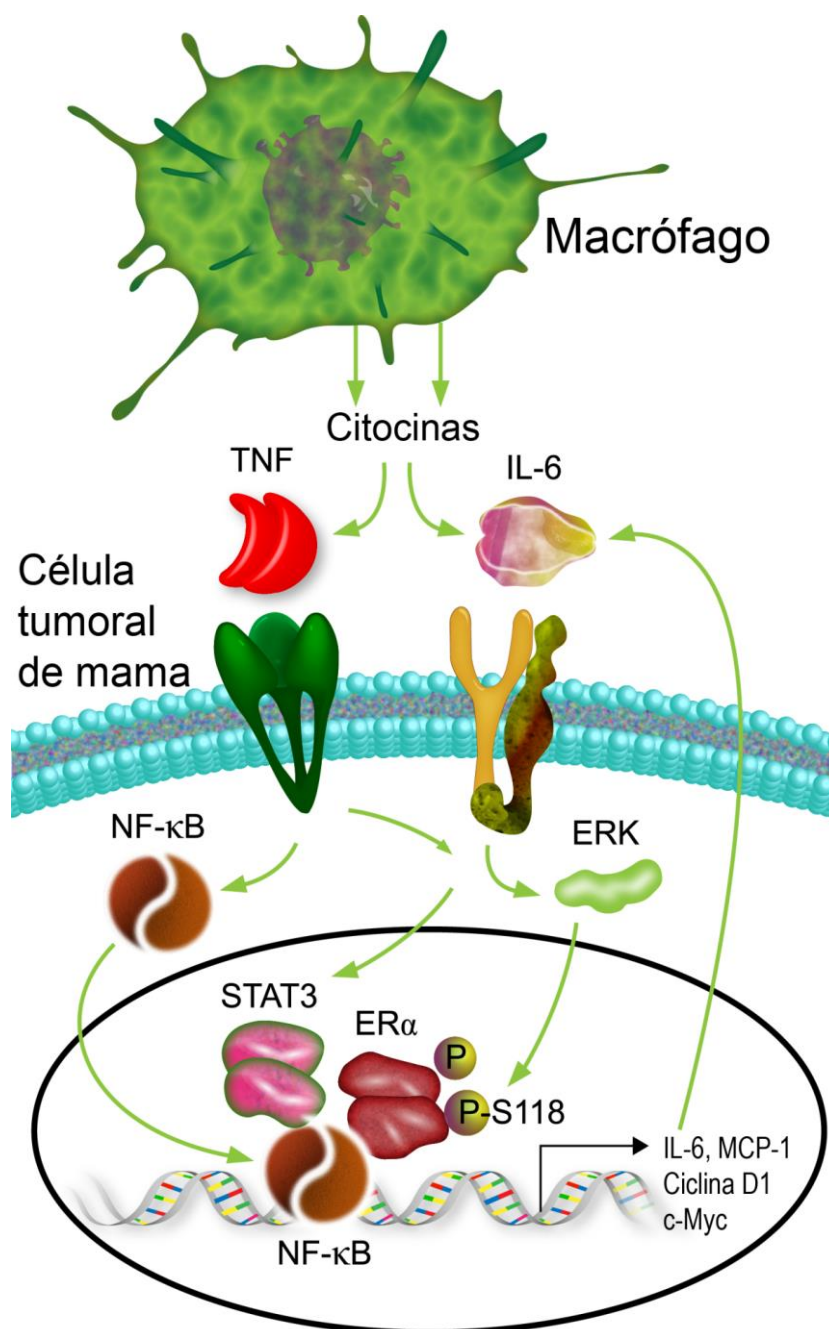
Además, junto con el complejo transcripcional descrito en el promotor de *ciclina D1* que involucraría a los factores de transcripción NF-kB, ER $\alpha$  y STAT3 también se observó una clara variación en el balance de los coactivadores CBP y SRC1 y del correpresor NCoR. En las células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados el tratamiento con TNF- $\alpha$  induce la unión de CBP, mientras que si en estas mismas condiciones se trata a las células con tamoxifeno se induce la unión de CBP, SRC-1 y NCoR (Fig. 16b). En diferentes trabajos se ha descrito que el complejo tamoxifeno-ER $\alpha$  ejerce su acción antitumoral a través del reclutamiento de NCoR en el promotor de los genes diana para ER $\alpha$  [173]. En este caso, si bien el tratamiento con tamoxifeno induce la unión de NCoR al promotor de *ciclina D1* no logra bloquear la expresión del



mismo (Fig. 13b) y las células MCF-7 en estas condiciones proliferan (Fig. 8). El incremento de los coactivadores SRC1 y CBP, ambos con capacidad histona acetiltransferasa, explicarían el hecho de observar un gen transcripcionalmente activo al mismo tiempo que el correpresor NCoR se encuentra unido. Además, como ya se dijo NCoR no posee capacidad represiva intrínseca, sino que la misma depende del reclutamiento de complejos que incluyen histonas deacetilasas. Por su parte, SRC-1 ha sido descrito como un inductor de resistencia endócrina en cáncer de mama [129] y es considerado como un predictor independiente de peor pronóstico en pacientes [174].

Los resultados de este trabajo de tesis en su conjunto permiten proponer un posible mecanismo por el cual las células de cáncer de mama ER+ podrían adquirir resistencia endócrina mediada por macrófagos (Fig. 29). Dicho mecanismo establece que genes claves involucrados en la proliferación celular como *ciclina D1* y *c-Myc* que normalmente se expresan por la vía canónica dependiente de E2-ER $\alpha$  podrían expresarse de forma alternativa mediante el estímulo de TNF- $\alpha$  e IL-6 de una manera independiente de estradiol. En resumen, la secuencia de hechos que conducirían a la adquisición de resistencia endócrina por parte de las células tumorales de mama ER $\alpha$ + podría ser la siguiente. Al tratar los tumores ER+ con antagonistas de dicho receptor se favorece la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ ) y quimioatrayentes (MCP-1, IL-8) vía NF-kB [160]. En concordancia, ha sido descrito que IL-6 a través de STAT3 es capaz de inducir la expresión de NF-kB en cáncer de próstata y melanoma [175, 176]. A su vez la expresión de MCP-1 genera un aumento de los macrófagos infiltrados en el tumor, la interacción entre los macrófagos y las células tumorales de mama ER $\alpha$ + en un micro-medioambiente proinflamatorio favorece la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6. Por consiguiente, IL-6 y TNF- $\alpha$  vía sus propios receptores inducen la activación de STAT3 y NF-kB respectivamente y estos mismos receptores activan la cascada de MAPK que conduce a la activación del ER $\alpha$  mediante la fosforilación de la serina 118 posiblemente por la quinasa ERK-1. NF-kB, STAT3 y pER $\alpha$ -S118 se unen al promotor de *ciclina D1* induciendo su expresión y la proliferación de las células tumorales. Vale aclarar que la disposición espacial de los factores de transcripción NF-kB, ER $\alpha$  y STAT3 mostrada en el esquema de la figura 29 es a fines ilustrativos y no debe ser considerada como una verdad absoluta ya que otros estudios son necesarios para determinar este aspecto.





**Fig. 29: Modelo del efecto de los macrófagos condicionados sobre las células de cáncer de mama ERα+.**

La ilustración representa la resistencia endócrina de las células de cáncer de mama ER+ mediada por la interacción con los macrófagos. Se muestra que las citocinas liberadas por los macrófagos activan los receptores de TNF-α e IL-6 en las células tumorales. A su vez, esto genera la activación NF-κB, de STAT3 y la fosforilación de ERα en la S118 mediante la quinasa ERK-1. La combinación de la activación de NF-κB, STAT3 y ERα fosforilado en la S118 es suficiente para inducir la expresión genes mitogénicos y proinflamatorios claves en la proliferación independiente de estradiol de las células tumorales de mama.

La evidencia acumulada sugiere que una alta densidad de TAMs infiltrados en el tejido tumoral se correlaciona con resistencia a diferentes terapias contra el cáncer [177]. En base a estos hallazgos, los TAMs emergen como un blanco atractivo en el campo de las terapias antitumorales. Estas estrategias terapéuticas incluyen la inhibición del reclutamiento de macrófagos dentro del tumor, suprimir o depletar los TAMs, bloquear el efecto adverso de los TAMs o convertirlos a un fenotipo antitumoral [178, 179]. En caso de comprobarse la hipótesis de que los TAMs inducirían resistencia a los tratamientos hormonales que buscan evitar la activación del ER, dichos tratamientos endocrinos serían más eficientes al aplicarse en combinación con este tipo de terapias que apuntan a eliminar a los TAMs del micro-medioambiente o reprogramarlos hacia un perfil antitumoral.

## Conclusiones

Se observó que el co-cultivo con macrófagos condicionados incrementa la proliferación, migración y la capacidad invasiva de células de cáncer de mama (Figs. 8 y 10). Uno de los hallazgos más relevantes de esta tesis es el hecho de que las células de cáncer de mama ER $\alpha$ +, las cuales normalmente necesitan del estímulo mitogénico con estradiol para poder proliferar, al interactuar con macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  adquieren la capacidad de proliferar de manera independientes de esta hormona. Esto se observó en células MCF-7 co-cultivadas con macrófagos condicionados *in vitro* e incluso *in vivo* en un modelo murino inmunodeficiente. En este caso se generaron tumores de xenoinjerto a partir de una mezcla de células MCF-7 y monocitos THP-1 donde dichas células tumorales ER $\alpha$ +

no sólo crecieron en ausencia de estradiol o al ser tratada con tamoxifeno o ICI 182,780, sino que lo hicieron a una mayor tasa mostrándose mucho más agresivas e invasivas (Fig. 12).

Se demostró que los macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  son capaces de modificar la expresión de una gran cantidad de genes en las células de cáncer de mama ER $\alpha$ +. Entre los genes que incrementan su expresión se encuentran los que codifican a varias citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-1, a factores quimioatrayentes de diferentes leucocitos como MCP-1, Rantes, IL8 y Gro junto con oncogenes involucrados en aspectos claves del crecimiento y promoción del tumor como son ciclina D1 y c-Myc (Figs. 20). Entre las citocinas proinflamatorias que se vieron sobre expresadas se destacan IL-6 y TNF- $\alpha$  comprobándose su participación de manera directa en el fenómeno de desarrollo de resistencia endócrina (Figs. 21 y 22). Se demostró que las vías de señalización TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B e IL-6/STAT3 se activan en las células de cáncer de mama MCF-7 producto del micro-medioambiente generado por la intercomunicación entre las células tumorales ER $\alpha$ +

y los macrófagos condicionados. La activación de tales vías mostró ser clave en la proliferación independiente de estradiol de las células MCF-7 (Figs. 18 y 26). Además, también se comprobó que el ER $\alpha$  es un partícipe necesario de este fenómeno junto con los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 (Fig. 19). En lo que a esto respecta, se comprobó que el ER $\alpha$  se fosforila en la serina 118 de manera independiente de ligando y que dicha fosforilación estaría mediada por la quinasa ERK-1 la cual podría activarse tanto por la vía de IL-6 como de TNF- $\alpha$  (Fig. 28).

Todo esto concuerda con lo que ocurre en el complejo transcripcional reclutado en

los promotores de genes claves en proliferación como *ciclina D1* y *c-Myc* de células MCF-7. Se observó una marcada diferencia en los factores de transcripción y corre reguladores que son reclutados en dichos complejos transcripcionales a partir de la presencia de los macrófagos condicionados. Se constató un marcado incremento de ER $\alpha$  y p65 en el promotor de *ciclina D1* y *c-Myc* ante el estímulo con TNF- $\alpha$  en células MCF-7, cuando las mismas se encuentran interaccionando de forma paracrina con los macrófagos condicionados (Figs. 16 y 17). En estas mismas condiciones también se determinó un aumento en el reclutamiento del factor de transcripción STAT3 en el promotor de *ciclina D1*, pero en este caso no se analizó qué sucede en el promotor de *c-Myc* (Fig. 27). Otro cambio importante fue el re-arreglo de los cofactores que forman parte del complejo transcripcional. El estímulo con TNF- $\alpha$ , ante la presencia de macrófagos condicionados, indujo un marcado aumento del coactivador CBP en el complejo transcripcional de los genes *ciclina D1* y *c-Myc* en las células MCF-7. En este caso el tratamiento con tamoxifeno provocó el reclutamiento del correpresor NCoR a los complejos transcripcionales de dichos genes, pero al mismo tiempo también indujo la unión del coactivador SRC1 junto a CBP mostrando solo una disminución parcial en la expresión génica (Figs. 16, 17 y 13).

En resumen en este trabajo de tesis se ha demostrado que los macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  son capaces de inducir resistencia endócrina en células de cáncer mama ER $\alpha$ + a través de un complejo proceso que involucra las vías de señalización TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, IL-6/STAT3 y MAPK/ER- $\alpha$  que estarían actuando de forma conjunta.

## **CAPÍTULO 2**

### **Efecto de las micro-calcificaciones de oxalato de calcio en cáncer de mama**

## Introducción

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más diagnosticados y es la principal causa de muerte en mujeres entre todas las enfermedades neoplásicas a nivel mundial [180, 181]. Una característica común en muchos tipos de tumores mamarios es la aparición de micro-calcificaciones, por ejemplo la mayoría de los casos de cáncer ductal *in situ* presentan micro-calcificaciones [182]. Debido a esto, la presencia de micro-calcificaciones en mamografías es utilizada de rutina para detectar tumores de mama en estadios tempranos lo cual tiene una vital importancia ya que permite la aplicación de terapias conservativas y resulta en un mejor pronóstico para las pacientes. Cerca de la mitad de los tumores mamarios no palpables son detectados solamente a través de las micro-calcificaciones que se observan en mamografías.

Las micro-calcificaciones mamarias pueden ser clasificadas por sus propiedades físicas y químicas en dos tipos bien distinguidos, las calcificaciones tipo I que se componen de oxalato de calcio (fórmula química  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ), las cuales son de color ámbar parcialmente transparente y forman estructuras piramidales con superficies planas, y las calcificaciones tipo II que están compuestas por fosfato de calcio (fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), siendo de color blanco grisáceo opaco y poseen una forma ovoide o fusiforme con superficies irregulares. Estas características fisicoquímicas hacen que los cristales de fosfato de calcio (CaP) sean más fáciles de observar que los de oxalato de calcio (CaOx) cuando se analizan los cortes histológicos bajo la luz de un microscopio. Para poder observar los cristales de CaOx de forma clara es necesaria la utilización de una luz polarizada [183].

Los cristales de CaOx son el tipo de micro-calcificaciones menos comunes o menos reportadas en el tejido mamario, siendo las más comunes las micro-calcificaciones de CaP [184, 185]. El hecho de que la detección de estas últimas sea mucho más fácil que las primeras podría estar influyendo en esta estadística. Se ha reportado que las calcificaciones de CaP incrementan la mitogénesis en células de mama y que pueden inducir la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) facilitando el crecimiento y la progresión tumoral [186]. También se ha demostrado que calcificaciones de CaP tienen la capacidad de inducir la expresión de IL-1 $\beta$  en líneas celulares de mama, estableciendo un micro-medioambiente proinflamatorio [187]. Por otra parte pocas investigaciones han sido realizadas con respecto a los efectos del oxalato de calcio en cáncer de mama. Los cristales de CaOx han sido asociados

principalmente con carcinomas *in situ* y quistes benignos [188-191] pero también han sido reportados en tumores invasivos, aunque en menor medida [189, 192]. Por todo lo expuesto, la presencia de micro-calcificaciones en biopsias mamarias tiene significancia clínica y es importante determinar su presencia.

El mecanismo por el cual se forman las micro-calcificaciones mamarias no se conoce con certeza, no se sabe si éstas se producen por un proceso celular activo o si son el resultado final de un proceso pasivo debido a la degeneración celular. Algunas evidencias apoyan la hipótesis de que el CaOx sería un producto de secreción mientras que el CaP se formaría por un proceso activo similar al de la mineralización de los huesos. Además, otros grupos han reportado que células epiteliales que adquieren características mesenquimales se vuelven capaces de producir micro-calcificaciones de CaOx [190, 191, 193]. El oxalato es producido por muchos tipos celulares como ser células de hígado, riñón, epiteliales y células de las glándulas apocrinas entre otras [188, 193-197]. El oxalato es un producto metabólico inerte ya que no puede ser metabolizado y se elimina principalmente por vía renal. El oxalato puede estar presente como ácido libre, como sal soluble de potasio o sodio o como sal insoluble tal como los mencionados cristales de oxalato de calcio [198, 199]. Es posible conjeturar que la acumulación de oxalato es tóxica para la mayoría de los tejidos ya que diversas patologías como quistes renales, hiperplasia de tiroides y neoplasias de mama han sido asociadas con este hecho [200]. También se ha comprobado que la exposición de células epiteliales de riñón a oxalato es capaz de disparar diversos eventos a nivel celular como la activación de la vía de p38-MAPK, inducción de genes de expresión temprana como *c-fos*, reinicio de la síntesis de ADN, expresión de IL-6, entre otros [201-205]. De hecho se ha visto por “array” de ADN que al exponer células renales a oxalato la expresión de 2276 genes disminuye y la de otros 750 aumenta [201].

A pesar de la importancia que revisten las micro-calcificaciones mamarias por su relevancia biológica y su valor pronóstico, escasos estudios se han llevado a cabo para conocer el impacto directo que causa la presencia de oxalato en el micro-medioambiente de tumores mamarios.

---

## Objetivo general

Hasta el momento nadie ha considerado al oxalato libre como un inductor importante de patologías mamarias. En este segundo capítulo se aborda la hipótesis de que la exposición crónica o prolongada de células epiteliales mamarias normales a oxalato induce alteraciones que promueven la aparición de un fenotipo neoplásico.

## Objetivos específicos

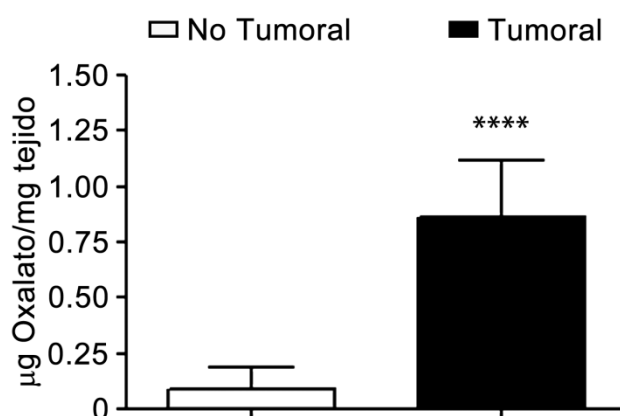
1. Determinar la concentración de oxalato promedio en tejido mamario tumoral y normal.
2. Estudiar los posibles efectos del oxalato sobre la proliferación de líneas celulares de mama tumorales y no tumorales.
3. Establecer si el oxalato libre tiene la capacidad de inducir la expresión de genes involucrados en la proliferación celular.
4. Determinar si el oxalato tienen un efecto carcinogénico en el micro-medioambiente de las células epiteliales de mama en un modelo *in vivo*.



## Resultados

**Los niveles de oxalato se encuentran incrementados en muestras de tumores mamarios.**

Con el objetivo de estudiar las implicancias biológicas del oxalato en los tumores mamarios, se determinó la concentración de oxalato tanto en muestras de tejido tumoral mamario como en tejido no canceroso adyacente al tumor por electrocromatografía capilar (CEC). En total fueron analizadas trece muestras de tejido tumoral y doce muestras de tejido sano (muestras control). La mayoría de las muestras fueron obtenidas de a pares de cada paciente. Se determinó que todas las muestras de tejido tumoral examinadas tenían una concentración de oxalato total sensiblemente mayor a la de su contraparte no tumoral o control ( $P \leq 0,0001$ ). La concentración promedio de oxalato total presente en las muestras tumorales fue casi diez veces mayor que las muestras control. Un análisis estadístico de estos datos revela una diferencia altamente significativa entre el grupo de muestras tumorales y control (Fig. 30).



**Figura 30: El tejido mamario tumoral posee mayor concentración de oxalato que el tejido de mama no tumoral.**

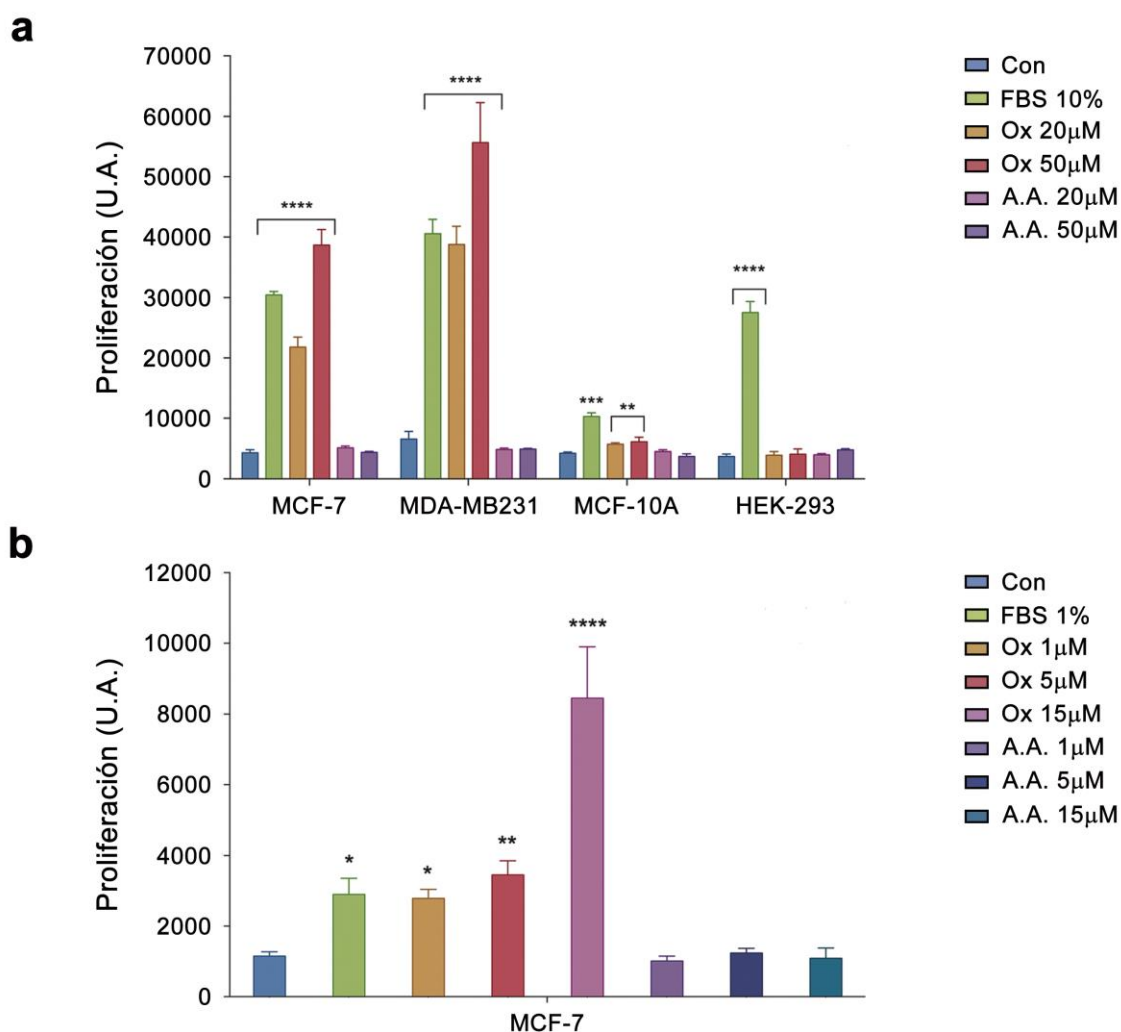
Muestras de tejido de tumores mamarios humanos (barra negra,  $n=13$ ) y de tejidos de mama no tumorales (Barra blanca,  $n=12$ ) fueron procesados con ácido clorhídrico 2,75 M y la concentración de oxalato total se determinó por electrocromatografía capilar. Los resultados se expresan en µg de oxalato total por mg de tejido. La estadística se realizó mediante una prueba t de Student de dos colas. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

**El oxalato induce proliferación en células epiteliales de mama.**

Debido a la alta concentración de oxalato encontrada en las muestras de tejido tumoral mamario la siguiente pregunta a responder fue si el oxalato podría producir algún efecto a nivel celular capaz de favorecer la génesis o el crecimiento tumoral. Con este objetivo, líneas celulares de cáncer de mama humanas fueron tratadas en cultivo con diferentes concentraciones de oxalato y luego se evaluó la proliferación. Dicho ensayo de proliferación celular se realizó mediante dos técnicas diferentes, cuantificando la cantidad de ADN total (Fig. 31a) y contando el número de células totales (Fig. 32), los cuales fueron realizados tres veces por cuadruplicado. Estos experimentos mostraron que el oxalato, en un rango de concentraciones entre 20 y 50  $\mu\text{M}$ , induce mayores tasas de proliferación en células MCF-7 y MDA-MB231 luego de tres días de tratamiento. Además, células MCF-7 tratadas por tres semanas con una concentración menor de oxalato (1, 5 y 15  $\mu\text{M}$ ) también mostró un incremento significativo en la proliferación (Fig. 31b).

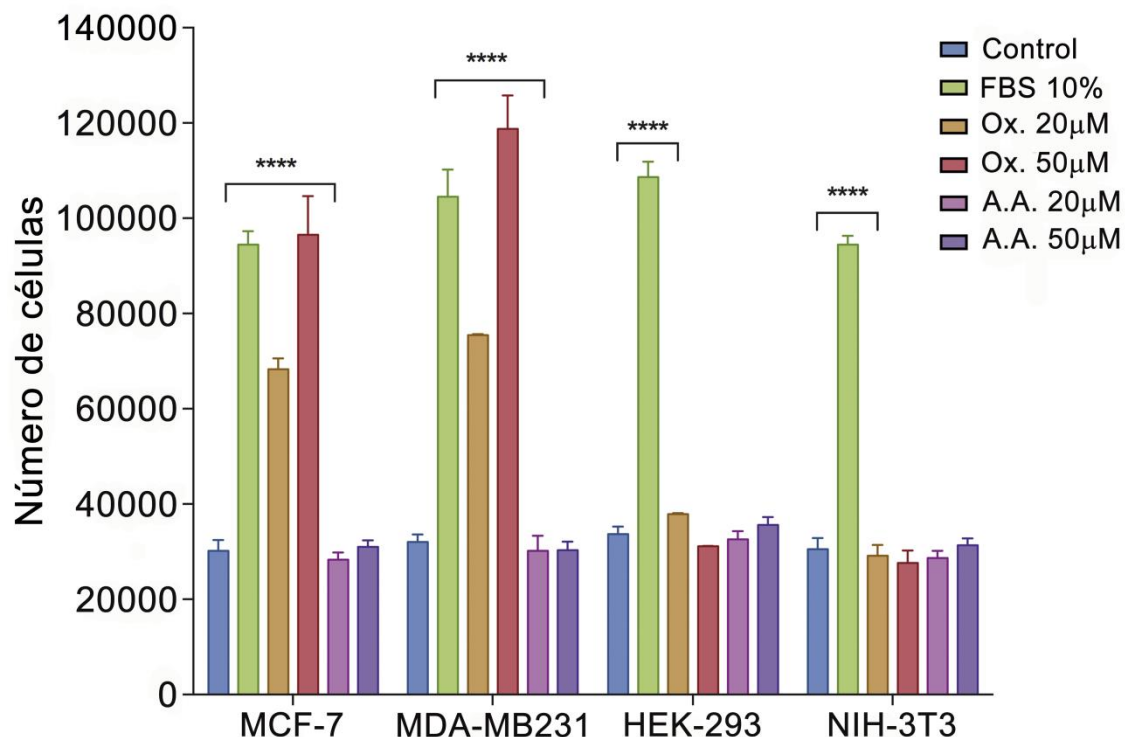
Es importante notar que en todos los casos el efecto del oxalato fue evaluado adicionando ácido oxálico en el mismo medio de cultivo empleado para los controles. Debido al pH del medio de cultivo y su capacidad buffer, el ácido oxálico pierde rápidamente sus dos protones quedando su base conjugada libre, el oxalato. Para excluir cualquier posible efecto del pH en este fenómeno, para cada caso se utilizó un control de ácido acético a la misma concentración que el ácido oxálico. Como se esperaba, ninguno de los controles con ácido acético mostró un incremento significativo en la proliferación como se observa en la figura 31 y 32. Controles similares fueron realizados utilizando ácido fumárico obteniéndose esencialmente resultados similares (resultado no mostrado). Curiosamente, el oxalato no tuvo efecto sobre líneas celulares de otros tipos como ser células HEK-293 (células epiteliales de riñón humanas) (Fig. 31a y 32) o NIH-3T3 (fibroblastos de ratón) (Fig. 32) lo que da indicios de que este fenómeno podría restringirse principalmente a células de linaje mamario. Sin embargo, células MCF-10A (una línea epitelial de mama no tumoral) fueron tratadas por tres días con oxalato a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  pero la inducción de la proliferación no se observó claramente. En consecuencia, se repitió el experimento tratando a las células MCF-10A con oxalato por un período de tiempo mayor (siete días) a las mismas concentraciones (Fig. 31a). Bajo estas últimas condiciones experimentales, en las cuales se prolongó el tiempo de exposición a oxalato, las células

MCF-10A mostraron un aumento significativo en la proliferación pero a una tasa menor con respecto a la que se observa cuando estas mismas células son tratadas conjuntamente con FBS. Además, se observó que esta línea celular de mama normal prolifera a una tasa menor que las líneas celulares de mama tumorales tanto bajo estímulo con FBS u oxalato (Fig. 31a). En resumen, estas fueron las primeras evidencias que muestran que el oxalato tiene un efecto sobre la proliferación de líneas celulares de mama.



**Figura 31: El oxalato induce proliferación en células de cáncer de mama.**

En (a) se muestran células MCF-7, MDA-MB231 y HEK-293 luego de 3 días de tratamiento. Las células MCF-10A recibieron 7 días de tratamiento. En (b) se muestran células MCF-7 tras 3 semanas de tratamiento. Las células fueron cultivadas en DMEM sin ningún aditivo en el caso del control o con la suplementación de los reactivos especificados. **Con:** control, **FBS:** suero fetal bovino, **Ox:** ácido oxálico, **A.A.:** ácido acético. El resultado expresa concentración de ADN en unidades arbitrarias (A.U.) obtenido por ensayo colorimétrico (CyQuant). La significancia estadística se determinó por un test ANOVA de dos vías seguida de un post-test de comparación múltiple de Holm-Sidak ( $\alpha = 0.05$ ). \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .



**Figura 32: El oxalato induce proliferación en células de cáncer de mama pero no se observa ningún efecto en las células de riñón ni fibroblásticas.**

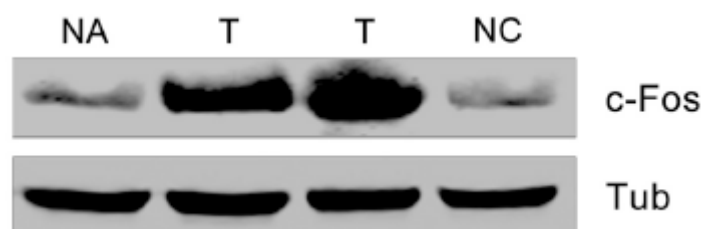
Células MCF-7, MDA-MB231, HEK-293 y NIH-3T3 fueron cultivadas en DMEM más los compuestos especificados, las células control fueron cultivadas con DMEM sin ningún aditivo. Luego de 3 días de tratamiento se cuantificó la proliferación contando manualmente el número de células con cámara de Neubauer. **Con:** control, **FBS:** suero fetal bovino, **Ox:** ácido oxálico, **A.A.:** ácido acético. La diferencia estadística fue determinada por test ANOVA de una vía seguido de un post-test de comparación múltiple de Holm-Sidak. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### El oxalato induce sobre-expresión de c-Fos en células MCF-7.

Los oncogenes *fos* y *jun* son miembros de la familia de genes de expresión temprana (IEGs) los cuales se expresan de manera rápida y transitoria en diferentes líneas celulares en respuesta a muchos tipos de estímulos tales como factores de crecimiento, neurotransmisores, etc. [200, 206-210]. Aunque c-Fos fue descripto como un factor de transcripción tipo AP-1 hace más de 25 años atrás, las complejas consecuencias de su inducción sobre la fisiología de la célula no han sido completamente dilucidadas hasta el momento. Se ha propuesto que, ante estímulos mitogénicos, c-Fos dispara y controla aspectos claves del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis debido a la regulación de genes claves. Además, c-Fos ha sido descripto como un activador de la biosíntesis de lípidos a nivel del citoplasma tanto en procesos celulares normales como

patológicos que demandan altas cantidades de biogénesis de membrana [211]. Los miembros de la familia de genes *fos* son probablemente los IEGs que se expresan con mayor frecuencia en los diferentes tipos de tumores humanos, su sobre-expresión ha sido reportada en diferentes desórdenes proliferativos tales como cáncer de mama, pulmón, colon, cerebro y tiroides [206, 208, 212].

En base a lo expuesto se analizó la expresión de la proteína c-Fos tanto en muestras de tejido mamario tumoral como en muestras de tejido sano adyacentes al tumor, las cuales fueron obtenidas de a pares de un mismo paciente (para más detalles ver materiales y métodos). Como se esperaba, se encontraron altos niveles de expresión de c-Fos en el tejido tumoral mientras que las muestras normales mostraron niveles bajos o no detectables de dicha proteína, confirmando los resultados obtenidos por Motrich et al. [212] (Fig. 33).



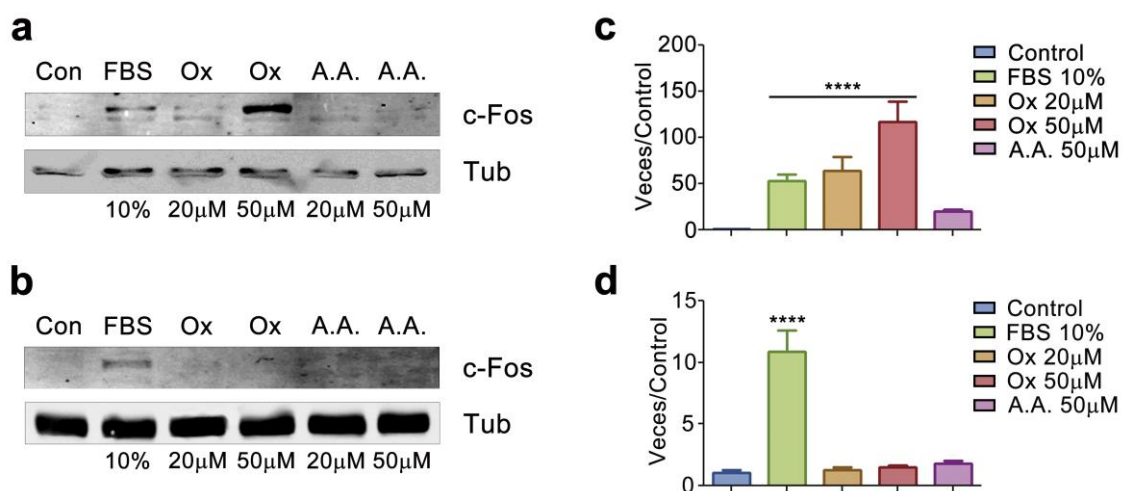
**Figura 33: c-Fos se encuentra sobre-expresado en tumores de mama humanos.**

Western Blot realizado a partir de extractos proteicos de tejido mamario tumoral (**T**), tejido posiblemente no canceroso adyacente al tumor (**NA**) y una muestra control de tejido de mama no patológico (**NC**). El Western Blot fue revelado con un anticuerpo anti c-Fos. Se determinó la cantidad de  $\alpha$ -tubulina (**Tub**) para ser utilizada como control de carga. Figura representativa de 5 experimentos independientes.

Por consiguiente, se evaluó la posibilidad de que el oxalato tenga la capacidad de inducir la expresión de c-Fos en líneas celulares de cáncer de mama. Esto se realizó exponiendo células MCF-7 en cultivo a diferentes concentraciones de oxalato por 1,5 h, luego las células fueron cosechadas y los niveles de la proteína c-Fos fueron evaluados mediante Western Blot (Fig. 34a). El ensayo mostró que el oxalato induce la sobre-expresión de c-Fos en un rango de concentración de entre 20 y 50  $\mu$ M en células MCF-7. Este resultado revela por primera vez que el oxalato es capaz de activar la vía de un IEG como *c-fos* exhibiendo un efecto a nivel genómico en células de cáncer de mama. Por el contrario, células HEK-293 (Fig. 34b) las cuales fueron tratadas con oxalato en paralelo con las células MCF-7 a las mismas concentraciones, no mostraron un incremento en la expresión de c-Fos. Esto es un fuerte indicio de que tal efecto podría

limitarse a líneas celulares de mama, lo que concuerda con lo observado a nivel mitogénico, donde el oxalato indujo proliferación solamente en líneas celulares de linaje mamario (ver punto anterior).

Para mayor confirmación de que el oxalato puede activar la vía de *c-fos* en células MCF-7 pero no en células HEK-293, se midieron los niveles de transcripto de este gen mediante RT-qPCR. Con este fin, ambas líneas celulares fueron tratadas 1,5 h con oxalato a diferentes concentraciones, como se describió previamente, y luego se midieron los niveles del mRNA de *c-fos*. Como se esperaba, el oxalato indujo un aumento significativo en los niveles del mRNA de *c-fos* en las células MCF-7 (Fig. 34c) pero no en las células HEK-293 (Fig. 34d).

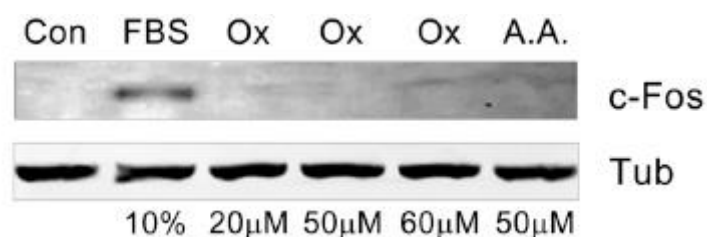


**Figura 34: El oxalato induce expresión de c-Fos en células MCF-7 pero no en células HEK-293.**

Células MCF-7 (a) y células HEK-293 (b) en cultivo fueron expuestas a FBS, ácido oxálico y ácido acético a las concentraciones que se especifican por 1,5 h. A partir del homogenato total de estas células se evaluó la expresión de c-Fos a nivel de proteína mediante Western Blot. Como control de carga se determinó  $\alpha$ -tubulina (Tub). MCF-7 (c) y HEK-293 (d) en cultivo fueron expuestas a los mismos estímulos que en (a) y (b) por 1,5 h. Luego las células fueron procesadas para determinar el nivel de expresión del mRNA de *c-fos* por RT-qPCR. Se utilizó como control interno el nivel de expresión de los genes GAPDH y RPLPO para las células MCF-7 y HEK-293 respectivamente. Se grafican las veces de cambio con respecto al control según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . El resultado es un promedio de tres experimentos independientes. **Con:** control (células sin estimular), **FBS:** suero fetal bovino, **Ox:** ácido oxálico, **A.A.:** ácido acético. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

La sobre-expresión de c-Fos mediante el estímulo con oxalato también se evaluó en una línea celular de fibroblasto de ratón NIH-3T3. Al igual que se hizo con las líneas celulares anteriores, las células HEK-293 fueron expuestas a concentraciones de 20, 50

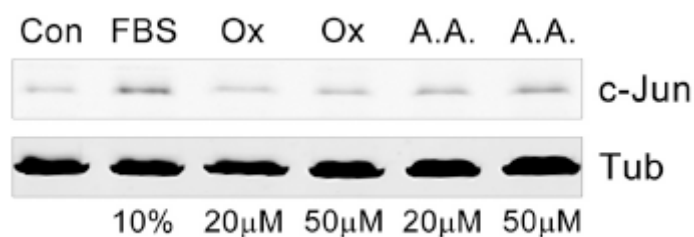
y 60  $\mu\text{M}$  de ácido oxálico por 1,5 h. Como control de posibles efectos debido a pequeñas variaciones en el pH se utilizó ácido acético 50  $\mu\text{M}$ . El nivel de expresión de c-Fos en el homogenato total se determinó mediante Western Blot (Fig. 35). El resultado obtenido con esta línea celular muestra que c-Fos se sobre-expresó ante el estímulo con FBS pero que la exposición a oxalato no indujo la expresión de dicha proteína.



**Figura 35: El oxalato no induce expresión de c-Fos en células NIH-3T3.**

Las células NIH-3T3 quiescentes en condiciones de arresto fueron estimuladas por 1,5 horas según se especifica en cada caso. **Con:** control (células sin estimular), **FBS:** suero fetal bovino, **Ox:** ácido oxálico, **A.A.:** ácido acético.  $\alpha$ -tubulina (**Tub**) fue analizada como control de carga. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

También fue analizada la inducción de la expresión de otro IEG como *c-jun* por oxalato en células MCF-7 bajo las mismas condiciones experimentales en las cuales se evaluó la expresión de *c-fos* en esta línea celular. El resultado obtenido mediante Western Blot muestra que el estímulo mitogénico con FBS indujo la sobre-expresión de c-Jun mientras que la exposición a oxalato no produjo un incremento en la expresión de esta proteína en relación al control (células sin estimular) (Fig. 36).



**Figura 36: El oxalato no induce la expresión de c-Jun en células MCF-7.**

Las células MCF-7 quiescentes en condiciones de arresto fueron estimuladas por 1,5 horas según se especifica en cada caso. **Con:** control (células sin estimular), **FBS:** suero fetal bovino, **Ox:** ácido oxálico, **A.A.:** ácido acético.  $\alpha$ -tubulina (**Tub**) fue analizada como control de carga. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

**El oxalato induce la formación de tumores en ratones Nu/Nu.**

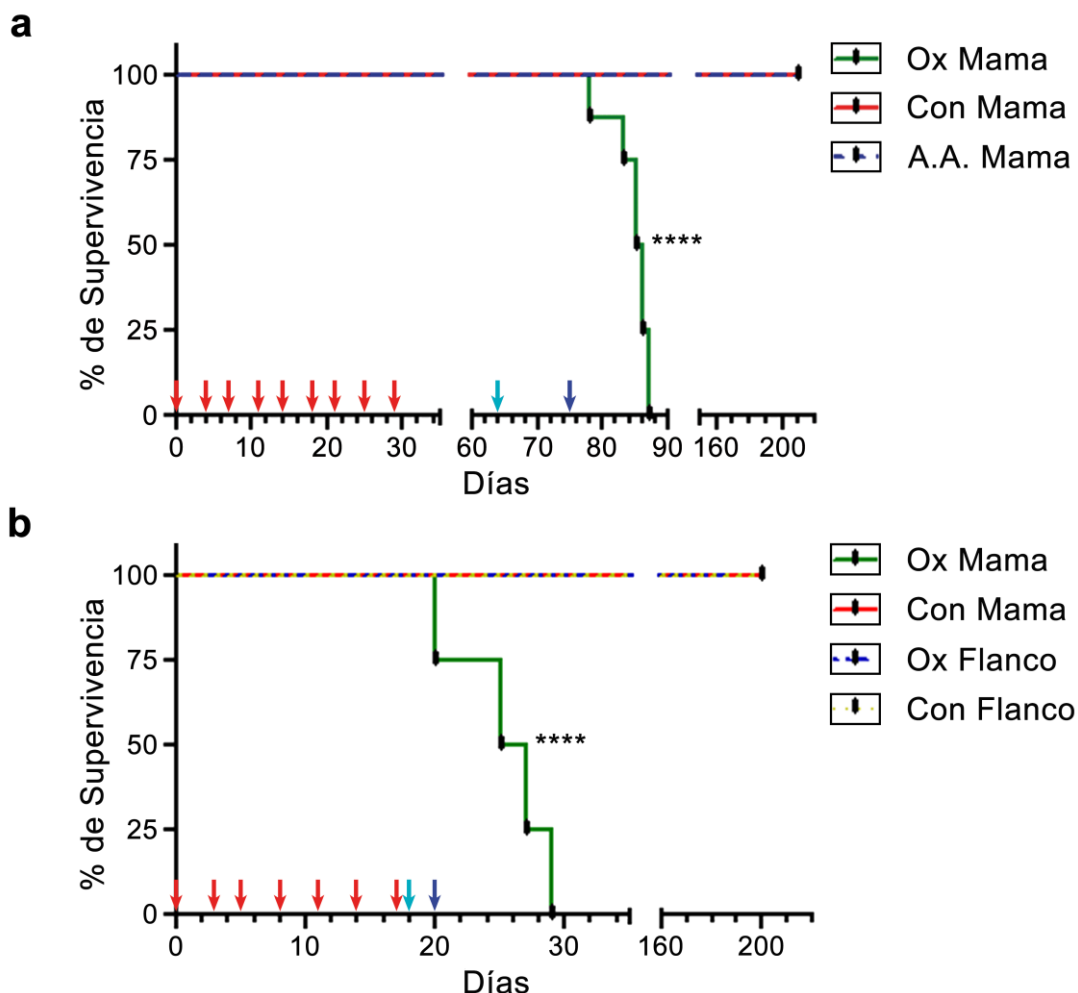
Con el objetivo de determinar la capacidad carcinogénica *in vivo* del oxalato, ratones fueron tratados con dicha molécula orgánica reproduciendo las condiciones experimentales en las cuales previamente se había evaluado la proliferación celular *in vitro*. Como se observó que el oxalato induce proliferación en las líneas celulares de mama en un rango de concentración entre 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , se decidió inyectar en los ratones una cantidad de oxalato tal que si se diluyese en todo el volumen de sangre del animal (aproximadamente 2 mL) se obtuviera una concentración de oxalato sistémica de 20  $\mu\text{M}$ . Dado que el volumen inyectado en cada dosis es de 50  $\mu\text{L}$  la concentración de oxalato en dicha solución fue de 810  $\mu\text{M}$ .

Por consiguiente, ocho ratones fueron inyectados en la almohadilla grasa de la mama inguinal izquierda con 50  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene micro-cristales de CaOx a una concentración de 810  $\mu\text{M}$  (grupo experimental). Para obtener los micro-cristales de CaOx se mezcló ácido oxálico 810  $\mu\text{M}$  con cloruro de calcio 1.8 mM antes de ser inyectados. Otros dos grupos, de seis ratones cada uno, fueron inyectados en la misma zona mamaria que el grupo experimental con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido acético 810  $\mu\text{M}$  o solamente con solución vehículo (grupos controles). El grupo de ratones que recibió las inyecciones con ácido acético fue un control para excluir cualquier efecto causado por posibles injurias por pH (Fig. 37a). En total, los ratones de los tres grupos recibieron 9 dosis de 50  $\mu\text{L}$  de la solución correspondiente en un lapso de 29 días (una inyección cada 3 o 4 días). Luego de que los ratones recibieran la última dosis fueron examinados y no se observó ni palpó ningún tumor. Sin embargo, luego de 64 días (35 días posteriores a la última inyección) un tumor palpable apareció en uno de los ratones del grupo experimental en la mama que había sido inyectada. En el día 73, la mayoría de los ratones del grupo experimental presentaban al menos un tumor en la mama inyectada (6 de 8 ratones). Finalmente, ya en el día 75 todos los ratones tratados con micro-cristales de CaOx habían desarrollado tumores e incluso algunos presentaban metástasis en la pleura pulmonar, pero ningún ratón de los grupos controles presentaba tumores.

Posteriormente los ratones del grupo experimental fueron sacrificados a diferentes tiempos teniendo en cuenta su estado de salud y volumen tumoral según aspectos éticos establecidos (ver materiales y métodos). Se examinaron sus órganos tales como el riñón, hígado, pulmón, bazo e intestinos y no se encontró ninguna anormalidad macroscópica.



Por otro lado, se mantuvo a los ratones de los dos grupos controles para un seguimiento *in vivo* hasta el día 200 del experimento, en donde no se observó la aparición de ningún tumor. Luego los ratones fueron sacrificados para examinar el estado de sus órganos internos los cuales no presentaron anomalías macroscópicas. Al realizar un análisis histológico del tejido mamario tampoco se detectó ninguna alteración.



**Figura 37: El oxalato induce la formación de tumores en el tejido mamario de ratones.**

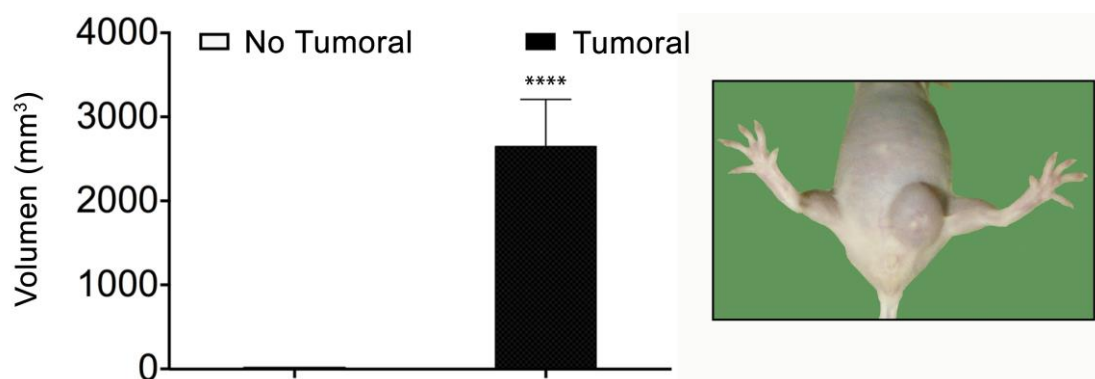
Se muestran dos gráficos de supervivencia de dos experimentos independientes. **(a)** Los ratones fueron inyectados en la almohadilla grasa de la mama cada 3 o 4 días, hasta un total de 9 dosis (flechas rojas). El grupo **Ox Mama**, que recibió micro-cristales de oxalato de calcio (ácido oxálico 810  $\mu\text{M}$  en solución vehículo con 1.8 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) fue el único en formar tumores. Los dos grupos controles **Con Mama** y **A.A. Mama** que fueron inyectados con solución vehículo con 1.8 mM de  $\text{CaCl}$  o con solución vehículo con ácido acético 810  $\mu\text{M}$  respectivamente no formaron tumores. Cada grupo estuvo conformado por 8 ratones. **(b)** Los ratones fueron inyectados cada 2 o 3 días hasta alcanzar un total de 7 dosis. A dos grupos se les suministró una solución salina con oxalato de potasio 810  $\mu\text{M}$  ya sea en la almohadilla grasa de la mama (**Ox Mama**) o en el muslo (**Ox Flanco**). Los controles respectivos a estos grupos (**Con Mama** y **Con Flanco**) fueron inyectados con solución salina sola. Sólo los ratones del grupo **Ox Mama** formaron tumores. Cada grupo tuvo un n de 4. Flecha celeste: día en el que apareció el primer tumor de mama. Flecha azul: día en el que todos los ratones del grupo **Ox Mama** presentaban al menos un tumor. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

En el experimento *in vivo* de la figura 37a, los ratones del grupo experimental recibieron oxalato a una concentración 810  $\mu\text{M}$  pero el cual se encontraba principalmente en estado sólido como micro-cristales de  $\text{CaOx}$ . Esto quiere decir que la concentración de oxalato libre según la constante de solubilidad de dicha sal sería de sólo 2.5  $\mu\text{M}$ . Aunque esta concentración de oxalato libre es bastante baja, vale recordar que incluso una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de oxalato fue capaz de inducir la proliferación de las células de cáncer mama MCF-7 luego de tres semanas de tratamiento en cultivo (Fig. 31b). En consecuencia, para evaluar el efecto del oxalato libre se llevó a cabo un nuevo experimento *in vivo* en el cual se inyectó oxalato a la misma concentración que antes (810  $\mu\text{M}$ ), pero en forma de oxalato de potasio la cual es una sal altamente soluble y no forma micro-cristales. En este caso también se decidió evaluar si existía cierta especificidad por el tejido mamario por lo que seis ratones fueron inyectados con oxalato de potasio en la almohadilla grasa de la mama y otros seis ratones fueron inyectados en el muslo de manera subcutánea, sendos grupos controles fueron inyectados en las mismas zonas respectivas con solución salina. Los ratones recibieron siete inyecciones en un lapso de 18 días (1 dosis cada 2 o 3 días).

Asombrosamente, el grupo de ratones inyectados en la zona mamaria con oxalato de potasio fue el único grupo que desarrolló tumores. Para el día 18 un ratón de este grupo presentaba un tumor palpable y para el día 20 ya todos los ratones presentaban tumores habiendo tres de ellos con metástasis en la pleura pulmonar. Estos ratones fueron sacrificados teniendo en consideración el volumen tumoral y su estado de salud general según los criterios éticos seguidos para el experimento anterior (ver materiales y métodos) lo cual se refleja en el gráfico de supervivencia de la figura 37b. El resto de los ratones de los otros tres grupos fueron mantenidos en observación hasta el día 200 del experimento donde no se observó la aparición de ningún tumor tanto en los ratones inyectados con solución salina como en los inyectados con oxalato de potasio en el muslo. Luego de este tiempo todos los animales fueron sacrificados y la ausencia de tumores o de otro tipo de patología fue confirmada por inspección de los órganos internos y análisis histológico.

El gráfico de supervivencia de la figura 37a muestra claramente las diferencias significativas entre el grupo experimental y los dos grupos controles. Esta diferencia en la sobrevida se explica por los tumores altamente agresivos que el oxalato produjo en los ratones del grupo experimental, los cuales alcanzaron un gran volumen en poco tiempo. Como se muestra en el gráfico de la figura 38, luego de 15 días de la aparición

del primer tumor palpable los tumores había desarrollado un volumen promedio cercano a los 2500 mm<sup>3</sup>. A modo representativo en la misma figura se muestra la foto de un ratón tratado con CaOx, donde se observa claramente el tumor formado en la zona mamaria.



**Figura 38: Los ratones tratados con micro-cristales de oxalato de calcio formaron grandes tumores en la mama.**

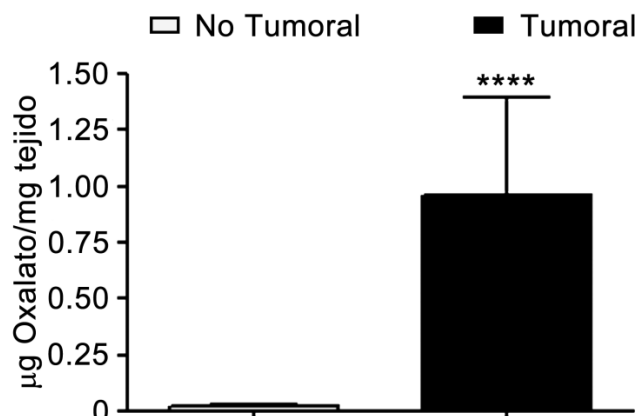
Los ratones recibieron 9 dosis de 50 µL de una solución 810 µM de CaOx cada 3 o 4 días o 50 µL de solución vehículo. Se muestra el promedio de 8 tumores medidos al día 79 del experimento. El volumen de los tumores se expresa en mm<sup>3</sup> calculado según la fórmula  $V = 0,4 \times (L \times S^2)$  donde  $L$  es el diámetro mayor y  $S$  el menor. A la derecha se muestra una foto representativa de los tumores formados por el tratamiento con oxalato. \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Esta es la primera demostración de que el oxalato es capaz de producir cáncer de mama *in vivo* al menos en ratones. Además, se observó que el oxalato tiene un efecto tejido específico indicando que habría algo en las células de la mama que es necesario para que el oxalato ejerza su efecto carcinogénico. Esta especificidad no solo se observó *in vivo* cuando el oxalato de potasio inyectado en la zona del muslo trasero no produjo tumor alguno sino también *in vitro* cuando el oxalato agregado al medio de cultivo no indujo proliferación en las células de fibroblastos de ratón NIH 3T3 ni tampoco en células epiteliales de riñón humanas HEK-293 (Figs. 31a y 32).

### **Análisis de los tumores generados por el oxalato.**

Se tomaron siete muestras de tejido de los tumores generados en los ratones a partir del tratamiento con oxalato para analizar por CEC la concentración de oxalato presente en los mismos. Como referencia también se analizaron por esta misma técnica siete muestras de tejido de mama de ratones control. Como era previsto, las muestras tumorales contenían una mayor concentración de oxalato que las muestras de tejido de mama no patológico ( $P \leq 0,0001$ ) y la concentración de oxalato total por mg de tejido

presentó valores muy similares a los hallados en las muestras de tumores de mama humanos (Fig. 39).

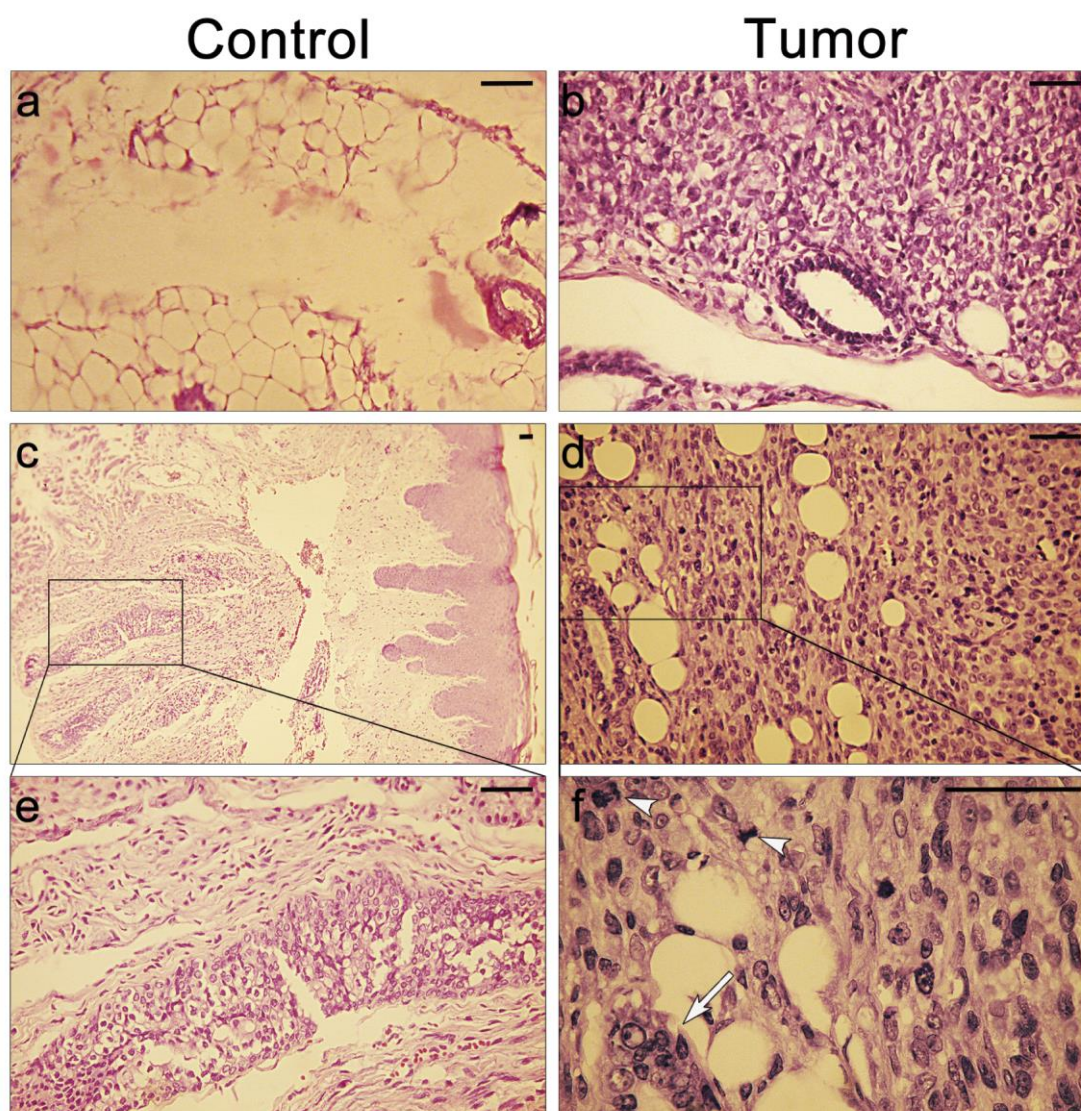


**Figura 39: Concentración de oxalato total presente el tejido mamario tumoral y no tumoral de ratones.**

Tejido de tumores de mama murinos (barra negra, n=7) y tejido de mama normal de ratones control (Barra blanca, n=7) fueron procesados con ácido clorhídrico 2,75 M y la concentración de oxalato total se determinó por CEC. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de oxalato total por mg de tejido. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Además, se hicieron cortes de los tumores de mama para su análisis histopatológico mediante tinción con H&E. Dos patólogos de forma independiente analizaron los cortes reportando que el tejido neoplásico se corresponde con un linaje altamente maligno e indiferenciado con características de fibrosarcoma de mama. En casi todos los tumores las células adoptaron un patrón dispuesto en fascículos de células fusiformes con extremos agudos y corrientes de grandes núcleos. En algunas otras áreas del tumor las células eran poliédricas con citoplasma acidófilo, núcleos angulares altamente pleomórficos también con grandes núcleos y numerosos nucléolos. El análisis de los cortes de tejido a un aumento de 40X demostró una alta actividad mitótica, a razón de más de 5 mitosis por campo, muchas de las cuales eran atípicas. Curiosamente, se encontraron células de mama epiteliales multinucleadas claramente anormales en los ductos mamarios. Mediante inmunohistoquímica se determinó una marcada positividad para vimentina y baja positividad para la proteína S100, antígeno sérico mamario (MSA) y para las citoqueratinas E1 y E3.

En las muestras de tejido mamario de todos los grupos control de ambos experimentos *in vivo*, las cuales fueron analizadas en doble ciego, no se encontraron células tumorales por tinción de H&E (Fig. 40).



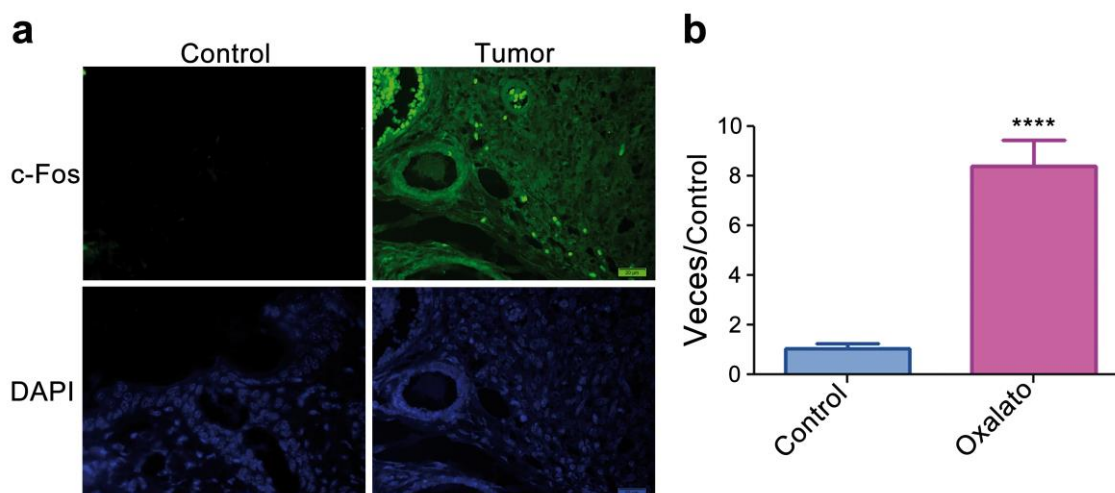
**Figura 40: El tratamiento con oxalato generó en los ratones tumores muy agresivos e indiferenciados.**

Se muestran 4 cortes de tejidos teñidos con H&E representativos tanto de muestras de mamas normales provenientes de los controles (**a** y **c**) como de los tumores mamarios producidos por del tratamiento con oxalato (**b** y **d**). Los paneles **e** y **f** son ampliaciones de los rectángulos delimitados **c** y **d** respectivamente. En el panel **f** se muestran eventos mitóticos (puntas de flecha) y células epiteliales anormales del ducto de la mama (flecha). Barra de escala 50  $\mu$ m.

Por otro lado también se analizó por inmunohistoquímica varios cortes de tejidos de los tumores generados por el oxalato y de tejido mamario no tumoral para evaluar los niveles de expresión de c-Fos. Se observó que en el tejido tumoral había mayores niveles de expresión de la proteína c-Fos en relación a los tejidos controles no patológicos (Fig. 41a). Para confirmar este resultado estas mismas muestras se analizaron por RT-qPCR utilizando cebadores para el mRNA de c-Fos. El resultado obtenido mostró que los niveles de mRNA de c-Fos fueron notablemente mayores en las



muestras tumorales que en las muestras control (Fig. 41b).



**Figura 41: El tejido tumoral mamario de los ratones expresa mayor cantidad de c-Fos que el tejido mamario normal.**

(a) Cortes de tejido de tumor de mama (n=6) generados a partir del tratamiento con oxalato y cortes de tejido no tumoral (n=6) provenientes de ratones control fueron analizados por inmunohistoquímica. Se muestran dos imágenes representativas reveladas para un anticuerpo anti c-Fos (verde) y los mismos cortes con las marcas nucleares correspondientes a la señal de DAPI (azul). (b) El nivel de mRNA de *c-fos* fue cuantificado en muestras de tejido de mama tumoral (n=5) y no tumoral (n=5) por RT-qPCR. Como control interno se utilizó la expresión del gen *Tbp*. Se grafican las veces de cambio con respecto al control según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \*\*\*\*P < 0.0001.

## Discusión

En este capítulo de la tesis se demostró por primera vez que el oxalato libre tiene la capacidad de inducir proliferación en líneas celulares mamarias como MCF-7 y MDA-MB231. Además, este efecto mitogénico también se pudo comprobar en una línea celular de mama normal MCF-10A, en cuyo caso fue necesaria una exposición más prolongada al oxalato y la proliferación inducida por el mismo fue menor en comparación con las líneas tumorales. Si bien el efecto mitogénico en las células MCF-10A fue menos marcado, su relevancia biológica no es menor ya que simula de mejor manera la génesis tumoral que ocurriría en un tejido sano.

Apoyando estos resultados, todos los ratones que recibieron inyecciones con oxalato en la almohadilla grasa de la mama desarrollaron tumores, lo cual demuestra un marcado efecto carcinogénico de esta sustancia. Las soluciones de oxalato que se utilizaron en cada uno de los experimentos *in vivo* fueron diferentes. Como se explicó anteriormente, si bien la concentración de oxalato total por dosis era la misma, la disponibilidad de oxalato libre al momento de la inyección fue mucho menor para el caso en el que se trató a los ratones con CaOx debido a la baja solubilidad de esta sal. Los ratones tratados con oxalato de potasio produjeron tumores en un período de tiempo mucho menor con respecto a los ratones tratados con CaOx. Esto establece una relación directa entre la cantidad de oxalato libre y la velocidad con la cual se generaron los tumores, reforzando la teoría de que el oxalato es un agente químico con capacidad de provocar tumores en el micro-medioambiente mamario. Es importante destacar que estos hallazgos son compatibles con los resultados de Morgan et al. 2012 [191] que demuestran que micro-cristales de CaOx no indujeron proliferación en células MCF-7 y MDA-MB231. En este trabajo se observa que sólo el oxalato libre en forma de ion tiene un potencial tumorigénico pero no así los cristales de CaOx.

Otro resultado importante que se desprende de los experimentos *in vitro* es que el efecto mitogénico fue observado únicamente en células de origen mamario, ni células humanas epiteliales de riñón (HEK-293) ni células de fibroblasto de ratón (NIH-3T3) proliferaron cuando fueron tratadas con oxalato. Además este hecho tuvo una correlación *in vivo* ya que el oxalato generó tumores en los ratones solo cuando fue inyectado en tejido mamario y no cuando fue inyectado en el muslo, indicando que el oxalato no produce tumores en cualquier tipo de tejido. Si bien no se conoce si el oxalato es capaz de generar tumores en otro tipo de tejido diferente al tejido mamario,

las evidencias obtenidas hasta el momento apoyan fuertemente la hipótesis de que la capacidad carcinogénica del oxalato sería específica para este tejido, aunque es necesario realizar más experimentos con un rango más amplio de líneas celulares para confirmar esto.

Por otro lado, el tipo de tumores que generaron los ratones tratados con oxalato en ambos experimentos fueron de un linaje indiferenciado altamente maligno con características de un fibrosarcoma de mama. También se observó un marcado incremento en la expresión de vimentina sumado a una baja expresión de citoqueratina lo que indica que el oxalato podría estar induciendo una transformación epitelio mesenquimal.

Se pudo observar también que los ratones BALB/c inmunodeficientes (Nu/Nu) son más susceptibles al tratamiento con oxalato que los ratones BALB/c inmunocompetentes (BALB/c wt). Los ratones BALB/c wt tratados con oxalato bajo las mismas condiciones experimentales que los BALB/c nude no desarrollaron tumores a pesar de dejarlos en observación 6 meses más. Sólo se pudo observar una pequeña hinchazón en la zona de la inyección dentro de las primeras 24-48 h. Es evidente que el SI tiene un rol clave en la génesis tumoral, sugiriendo que el sistema de defensa del organismo estaría siendo suficiente para evitar la formación de un tumor palpable bajo estas condiciones experimentales.



---

## Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta parte de la tesis es posible extraer importantes conclusiones. En principio podemos afirmar que el oxalato como ion libre tiene la capacidad de inducir proliferación en diferentes líneas celulares de mama tumorales, como las MCF-7 y MDA-MB231, y no tumorales como las MCF-10A en un amplio rango de concentraciones. También se observó una correlación positiva entre la tasa de proliferación y la concentración de oxalato libre presente en el medio, al menos hasta una concentración de 50  $\mu\text{M}$ .

Además fue posible determinar la capacidad carcinogénica del oxalato utilizando un modelo de ratones BALB/c inmunodeprimidos en donde se inyectó oxalato de manera periódica en la almohadilla de grasa de la mama. Llamativamente, el oxalato generó cáncer de mama con un 100 % de penetrancia y los tumores que se generaron fueron en todos los casos altamente agresivos e indiferenciados.

El hecho de que el oxalato libre en forma de sal soluble sería el responsable de los efectos mitogénicos y tumorigénicos nos permite pensar que esta molécula podría estar activando directa o indirectamente vías de genes claves. En este sentido se determinó por primera vez que esta molécula es capaz de inducir la expresión del proto-oncogen c-Fos en la línea celular de cáncer mama MCF-7. Previamente había sido reportado que el oxalato tiene la capacidad de producir cambios en los niveles de expresión de una gran cantidad de genes en una línea celular humana de riñón [201].

El mecanismo por el cual el oxalato ejerce su acción sobre las células mamarias no se conoce en absoluto y aunque los resultados aquí mostrados son un pequeño avance en este sentido, más estudios para tratar de dilucidar las vías de señalización involucradas en este proceso son necesarios. Es esperable que si se logra reducir la acumulación del oxalato en el tejido mamario o su acción carcinogénica esto tenga un impacto directo en reducir la incidencia de cáncer de mama o al menos en disminuir el grado de agresividad.

---

## Conclusiones generales sobre el micro-medioambiente tumoral

En las últimas décadas se ha obtenido una vasta cantidad de evidencia la cual indica que un tumor no se circunscribe solamente a células neoplásicas que han perdido la capacidad de controlar su tasa de división, sino que parte importante de un tumor está conformado por el estroma circundante. La mayoría de los tumores, por no decir todos, presentan algún tipo de alteración en su estroma. Muchos estudios han mostrado alteraciones epigenéticas que llevan a una expresión génica aberrante de las células estromales [12, 213, 214]. El estroma de un tumor se compone por los vasos sanguíneos, la matriz extracelular y otras células no malignas como fibroblastos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Se ha demostrado una activa y compleja interacción entre las células neoplásicas y los diferentes componentes del estroma que dan origen al micro-medioambiente tumoral. La importancia del micro-medioambiente tumoral es tal que es considerado un elemento crítico en el desarrollo y progresión de un tumor. El impacto que tiene el micro-medioambiente sobre la evolución de un tumor es tan importante que en muchos casos ha podido ser utilizado como elemento diagnóstico. Por ejemplo, comparando la expresión génica del estroma en pacientes de cáncer de mama se encontraron 26 genes relacionados con hipoxia y angiogénesis con los cuales se pudo pronosticar la evolución clínica de los pacientes [13].

En diferentes trabajos se ha visto que cada uno de los componentes del estroma tiene la capacidad de influir en el micro-medioambiente tumoral. En este sentido el aporte de las células del SI es preponderante. En general las células dendríticas, los linfocitos T CD8+, células asesinas naturales (NK), linfocitos T colaboradores 1 (Th1) y macrófagos M1 tienen un efecto antitumoral [28, 34]. Por otro lado, células como linfocitos T cooperadores 2 (Th2), T cooperadores 17 (Th17), T reguladores (Treg), macrófagos M2 y linfocitos B ejercen un efecto protumoral principalmente [29, 31, 32, 38, 42]. El impacto que tienen las células del SI sobre la evolución tumoral se ha debatido por décadas. Al presente se puede decir que estas células cumplen un rol dual, con la capacidad de eliminar las células neoplásicas o promover su crecimiento dependiendo del resultado del complejo sistema de señales del micro-medioambiente. Muchos concuerdan con que el micro-medioambiente de un tumor se asemeja al de una inflamación crónica, como el de una herida en proceso de sanación. En concordancia con esto numerosos estudios han relacionado diferentes citocinas proinflamatorias como

IL-6 con la promoción y metástasis en cáncer de mama [215].

En esta tesis se describe el mecanismo por el cual el micro-medioambiente formado por la interacción entre células de cáncer de mama ER $\alpha$ + con macrófagos condicionados conlleva a la resistencia de las células tumorales al tratamiento con tamoxifeno o ICI 182,780, ambos inhibidores del receptor de estrógenos. También se muestra cómo la presencia de oxalato libre en el micro-medioambiente de células epiteliales de mama de forma crónica tiene la capacidad de inducir proliferación y tumores altamente agresivos en un modelo *in vivo*. En muchos otros casos también se ha reportado la influencia que tiene el micro-medioambiente tumoral sobre la evolución de la enfermedad y en cuanto al desarrollo de resistencia al tratamiento con diferentes drogas. Por ejemplo, el bloqueo de la vía de NF-kB en células mesenquimales estromales de médula ósea redujo la resistencia al tratamiento con una droga específica en células de leucemia tanto *in vivo* como *in vitro* [216]. Otro ejemplo es que la inhibición de MCP-1 en el micro-medioambiente de tumores de próstata conlleva a la disminución de metástasis en un modelo en ratón [217]. Finalmente podemos mencionar que la inhibición de la vía de Notch en fibroblastos suprime el efecto protector a la radioterapia en tumores de xenoinjerto en un modelo de ratón [218].

Ejemplos como estos demuestran que los tratamientos antitumorales no deberían ser dirigidos solamente contra las células neoplásicas malignas sino también contra el micro-medioambiente con el objetivo de mejorar el resultado de las terapias. Una ventaja con respecto a esto es que las células estromales por lo general presentan estabilidad genómica y por tanto es menos probable que desarrollen resistencia a los tratamientos. Por otro lado el riesgo latente en este tipo de estrategia terapéutica es el de producir efectos colaterales no deseados debido a la posible disrupción del adecuado equilibrio homeostático. Se hipotetiza que el desarrollo de estrategias terapéuticas que logren romper la interacción entre las células neoplásicas con determinados componentes del estroma podría modificar el micro-medioambiente en el cual las células tumorales se ven favorecidas. Para lograr esto es necesario conocer los mecanismos moleculares a través de los cuales las células neoplásicas logran adquirir ventaja frente al propio SI y resistencia a las terapias antitumorales.

## Materiales y métodos

### Capítulo 1

#### Cultivos celulares

Las células MCF-7, T-47D, ZR-75-1, BT-474, SK-BR3, MDA-MB231, HS 578T y HCC1395 adquiridas de ATCC-Bethesda, MD, USA fueron mantenidas en condiciones estándares de cultivo con ligeras modificaciones. Brevemente, las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) sin rojo fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y antibiótico PSN (penicilina, estreptomicina y neomicina) 1X (ThermoFisher). Siempre que se necesitó sincronizar las células mediante arresto del ciclo celular, éste se realizó privando totalmente el medio de cultivo de FBS por 48 h. La línea monocítica THP-1 se mantuvo en medio DMEM suplementado con 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, PSN 1X y 10 % de FBS. Por su parte los monocitos de la línea celular KG-1 fueron cultivados en DMEM suplementado con antibiótico penicilina, estreptomicina y neomicina (PSN) 1X y 20 % de FBS. Todas las células fueron mantenidas en una atmósfera controlada con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las líneas celulares de mama fueron utilizadas hasta un número máximo de pasajes post descongelado no mayor a 12 ó 13 y las líneas monocíticas se utilizaron hasta el pasaje 5 o 6. Al momento de descongelar cada stock de células siempre se verificó que tengan un crecimiento y morfología normal. Además, se realizaron ensayos de Hoechst 33258 y PCR para descartar posibles contaminaciones con micoplasma [219, 220].

#### **Transfección de células MCF-7 con los plásmidos que expresan IκBα-SR., ERα o ERα-S118A**

El gen que codifica para el IκBα mutado (S32A y S36A) llamado IκBα-SR se encuentra clonado en el vector pBabe-Puro-IκBα-mut en el sitio EcoRI, el cual fue un obsequio de William Hahn (Addgene plasmid # 15291). Por otro lado, el ADNc del ERα y el ERα mutado (S118A) fueron subclonados en el vector pIRESneo-FLAG/HA EYFP en el sitio EcoRI/BamHI. Este plásmido fue un obsequio de Thomas Tuschi (Addgene plasmid # 10825).

Al momento de ser transfectadas las células MCF-7 se encontraban en un 60-70 % de confluencia en placas de 35 mm con 2 mL de medio de cultivo DMEM sin suero. Para

transfectar se utilizó el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, cat # 11815091001) siguiendo el protocolo estándar. Brevemente, en un tubo estéril se colocaron 97  $\mu$ L de DMEM sin suero ni factores, 6  $\mu$ L del reactivo FuGENE y 1  $\mu$ g de ADN plasmídico en este mismo orden. Esta mezcla se agitó vigorosamente unos segundos y se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Luego la misma se vertió en forma de goteo sobre las células MCF-7, se mezcló suavemente y se incubó 8 h en estufa. Pasado este tiempo se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco.

### **ARN pequeño de interferencia (siRNA)**

Las células MCF-7 fueron transfectadas con los siRNA de ON-TARGETplus-Smart Pool (Dharmacon, GE), el cual consiste en una mezcla de 3 siRNA como reactivos individuales. Cada uno de estos siRNA tiene como blanco el ER $\alpha$  (Cat # 003401), STAT3 (Cat # 003544), GP-130 (Cat # 005166) que es la sub-unidad del receptor IL-6. Se utilizó el reactivo de transfección de siRNA Xtreme-Gene (Roche) siguiendo el protocolo de fabricación con modificaciones menores. Se esperó 72 horas luego de la transfección antes de tratar las células según cada experimento para garantizar la baja en la expresión génica del gen blanco.

### **Cultivo de macrófagos primarios humanos**

Los monocitos fueron obtenidos a partir de sangre entera de donantes sanos. En una primera etapa se aislaron las células mononucleares de baja densidad, principalmente monocitos y células mesenquimales estromales. Para ello se utilizó centrifugación en gradiente de Ficoll-paque Premium 1,073 g/mL (GE Healthcare) de acuerdo al protocolo estándar. De forma resumida, 2 mL de sangre entera tratada con anticoagulante (Heparina) se diluyó a la mitad con 2 mL de buffer isotónico (D-glucosas 0,01 %, CaCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 98  $\mu$ M, KCl 0,54 mM, Tris 14,5 mM y NaCl 126 mM). Luego en un tubo estéril con 3 mL de Ficoll se colocó suavemente la sangre diluida para no romper la interfaz. Esto se centrifugó en centrífuga refrigerada (18 °C) con rotor basculante a 400 g por 30 minutos sin el freno automático. Se tomó la capa de células mononucleares que queda entre la fase de Ficoll y la de plasma y se la transfirió a un nuevo tubo estéril donde se realizó un lavado con aproximadamente 6 mL de buffer isotónico. Las células se volvieron a centrifugar a 400 g por 15 minutos y se procedió a la purificación de los monocitos utilizando el kit EasySep Monocyte Enrichment (StemCell Technologies). Este kit se basa en la selección negativa de los monocitos

(CD14+), es decir que las células no deseadas son seleccionadas por una batería de anticuerpos unidos a partículas magnéticas y posteriormente eliminadas mediante el empleo de un potente imán. Luego los monocitos son plaqueados en medio RPMI 1640 (GIBCO) al 65 % mas 15 % de Opti-MEM (GIBCO) suplementado con 10 % de FBS (GIBCO) y PSN 1X. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos con 10 ng/mL de M-CSF recombinante humano (ThermoFisher) y se colectaron las células adherentes luego de 3 o 5 días [141].

### **Diferenciación y condicionado de macrófagos**

Los monocitos primarios fueron diferenciados a macrófagos con 10 ng/mL de M-CSF recombinante humano como se detalla en el punto anterior. Los monocitos de las líneas KG-1 y THP-1 fueron inducidas a diferenciar mediante el protocolo adaptado de Marie Genin *et al.* (2015) [221] mediante el tratamiento con 50 ng/mL de forbol 12-miristrato 13-acetato (PMA) por 48 horas. Luego se tomaron las células adherentes (macrófagos) para los experimentos posteriores. Una vez obtenidos los macrófagos, éstos se mantienen en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en el mismo medio de cultivo utilizado con la línea monocítica de la cual provienen (ver en “Cultivos celulares”). El condicionado de los macrófagos se realiza mediante la adición de 1 ng/mL de TNF- $\alpha$  recombinante humano (ThermoFisher) al medio de cultivo. Luego los macrófagos son mantenidos en estufa por 6 horas y pasado este tiempo se les retira el medio, se lavan y se le vuelve a agregar medio fresco completo u otro medio según se detalla en cada experimento.

### **Medio condicionado de macrófagos y co-cultivo**

Luego del condicionado de los macrófagos con TNF- $\alpha$  como se detalla en el punto anterior, los mismos son cultivados por 24 horas en medio de cultivo DMEM sin rojo fenol ni FBS. Luego de este tiempo se colecta el medio de cultivo sin despegar los macrófagos y se lo centrifuga a 300 g por 10 minutos a 4 °C para retirar posibles restos de células. Por último, el medio es filtrado con una membrana de 0,22  $\mu$ m, alicuotado y almacenado a -70 °C. Para obtener medio condicionado de macrófagos co-cultivados con células MCF-7 el procedimiento es muy similar al anterior pero con algunas variantes. Primero, los monocitos son diferenciados a macrófagos sobre la membrana porosa de pocillos de inserción para placa de 35 mm. Los poros de esta membrana son de 0,4  $\mu$ m de diámetro por lo que no pueden ser atravesados por los macrófagos pero si por los mediadores químicos y demás solutos presentes en el medio. Después de que los

macrófagos se adhieren a la membrana y son condicionados con TNF- $\alpha$  se transfiere el pocillo de inserción a otra placa que tiene células MCF-7 entre un 70 y 80 % de confluencia. De esta forma los macrófagos y células MCF-7 son cultivados juntos por 24 horas también en DMEM sin rojo fenol ni FBS. Finalmente este medio se centrifuga, filtra y almacena como se explica arriba.

### **Ensayos de proliferación**

Los ensayos de proliferación fueron realizados utilizando placas de 96 pocillos y pocillos de inserción estilo Boyden con membrana porosa. El tamaño de los poros utilizados fue de 0,4  $\mu\text{m}$  lo cual evita el paso de una célula hacia el pocillo de abajo pero permite la circulación de todos los solutos y mediadores químicos. Se sembraron 4000 células tumorales de mama en el pocillo inferior y en el pocillo superior se colocaron macrófagos condicionados con TNF- $\alpha$  o nada según se detalla en cada caso. La proliferación de las células de mama se cuantificó luego de 72 horas de cultivo utilizando el reactivo CyQuant (Molecular Probes) siguiendo el protocolo estándar. Este reactivo se une al ADN y emite fluorescencia la cual es directamente proporcional a la cantidad de ADN y por lo tanto directamente proporcional al número de células. Para ello se hicieron curvas de calibración con las diferentes líneas celulares relacionando intensidad de señal y cantidad de células.

### **Ensayo de formación de colonias**

El ensayo de formación de colonias en agar blando se realizó según un protocolo adaptado del de Kakuguchi *et al.* (2010). De forma resumida, para la capa inferior se preparó una solución de DMEM sin rojo fenol con 0,75 % p/v de agar más el factor de cada condición según se aclara en la figura. Se colocó 1,5 mL en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se dejó endurecer 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se preparó la capa superior que consiste en DMEM sin rojo fenol con agar al 0,36 % p/v más el respectivo factor de crecimiento o droga del tratamiento, también se colocó 1,5 mL en cada pocillo. Esta capa superior es la que contiene las células MCF-7 a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/mL y en los casos de co-cultivo con macrófagos se adicionaron monocitos KG-1 hasta una densidad de  $3 \times 10^3$  células/mL. La capa superior se dejó endurecer a temperatura ambiente por 30 minutos y se agregó la última capa de alimentación que consiste en 100  $\mu\text{L}$  de medio de igual composición a la capa superior pero sin agar lo cual previene la evaporación. Luego la placa se llevó a estufa

para su cultivo durante 21 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> donde la capa de alimentación se renovó cada 2 días. Para la cuantificación del experimento se tomó una imagen de la placa con un escáner y se contó el número de colonias formadas con el software libre ImageJ.

### **Ensayo de migración**

La migración se evaluó utilizando pocillos de inserción estilo Boyden en placas de 24 pocillos. En este caso los poros de la membrana del pocillo de inserción tienen un diámetro de 8 µm. Las células MCF-7 fueron previamente teñidas con el fluoróforo CellTrace Calcein Red-Orange (AM). Para ello se retiró el medio de cultivo se realizó un lavado con PBS y luego se agregó el volumen necesario del fluoróforo 1x para cubrir toda la placa. Se incubó 30 minutos a 37 °C en estufa con 5 % de CO<sub>2</sub> y luego se extrajo el medio y se hicieron 3 lavados con PBS para eliminar todo el fluoróforo que no ingresó a las células. Las células MCF-7 fluorescentes fueron despegadas con tripsina 0,25 % y resuspendidas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio DMEM sin rojo fenol. Se colocaron 100 µL de esta suspensión sobre la membrana del pocillo de inserción y se dejó 10 minutos en estufa para que las células MCF-7 se depositen en el fondo del pocillo. Luego se colocó en el pocillo inferior medio de cultivo, el cual contiene los diferentes factores según cada condición, hasta un volumen que le permite hacer contacto con el pocillo superior (~600 µL). En los casos en los cuales se realizó co-cultivo con macrófagos,  $4 \times 10^4$  monocitos KG-1 fueron diferenciados con PMA en el pocillo inferior y luego condicionados con TNF- $\alpha$  por 6 horas antes de colocar el pocillo de inserción. Luego de 48 horas de cultivo en estufa se retiraron los pocillos de inserción y se cuantificó la fluorescencia mediante un fluorómetro de placas. Se estableció como el 100 % de migración a una intensidad de fluorescencia igual a la que se obtiene al sembrar  $1 \times 10^5$  células marcadas directamente en el pocillo inferior.

### **PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)**

El ARN total se extrajo de las líneas celulares empleando RNeasy Mni Kit (Quiagen). Un microgramo de ARN total fue retro-transcripto a ADNc utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen). Se utilizaron cebadores específicos Taqman (validados) que fueron adquiridos de Applied Biosystems, se emplearon cebadores con IDs NM\_000000. Las reacciones en tiempo real se realizaron empleando el equipo ABI 7500 Sequence Detection System y el análisis de los



resultados se llevó a cabo con el software v1.4. La expresión relativa de los genes fue calculada utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y el  $\Delta\Delta C_t$  fue obtenido utilizando el gen 18S como control interno. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado.

**Tabla de cebadores TaqMan utilizados**

Gen	Especie	Código	Dye	Amplicón
<i>stat3</i>	Humano	Hs00374280_m1	FAM-MGB	70
<i>ciclina D1</i>	Humano	Hs00765553_m1	FAM-MGB	57
<i>c-Myc</i>	Humano	Hs00153408_m1	FAM-MGB	107
<i>IL-6</i>	Humano	Hs00174131_m1	FAM-MGB	95
<i>MCP-1 (CCL-2)</i>	Humano	Hs00234140_m1	FAM-MGB	101
<i>Rantes (CCL-5)</i>	Humano	Hs00982282_m1	FAM-MGB	70
<i>ER-alpha (ESR1)</i>	Humano	Hs01046816_m1	FAM-MGB	65
<i>RNA Ribosomal 18S</i>	Humano	Hs03928990_g1	FAM-MGB	61

### Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se realizó con el kit de Millipore (Cat # 17-295) siguiendo el protocolo de manufactura con algunas modificaciones menores. Todos los buffers utilizados fueron de Millipore. Para cada condición se utilizaron  $3 \times 10^6$  células, las cuales fueron sincronizadas por dos días de arresto en DMEM sin rojo fenol suplementado con 0,2 % de FBS (Gibco) tratado con carbón activado (Sigma). Este tratamiento sobre el FBS elimina las hormonas esteroideas para que no interfieran en el ensayo. Luego del arresto las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina 2,5 nM por dos horas lo cual bloquea la transcripción de las RNA polimerasas, especialmente la Pol II. Acto seguido las células de cada condición fueron tratadas por otras dos horas con estradiol 1  $\mu$ M, TNF- $\alpha$  1 ng/mL, tamoxifeno 1  $\mu$ M, ICI 182,780 1  $\mu$ M o con las combinaciones respectivas que se detallan en cada figura. En los casos del co-cultivo con macrófagos, éstos fueron diferenciados a partir de monocitos KG-1 en un pocillo de inserción con membrana semi-permeable (tamaño de poro de 0,4  $\mu$ m), condicionados con TNF- $\alpha$  (ver arriba “Diferenciación y condicionado de macrófagos”) y finalmente colocados junto con las células MCF-7 después del tratamiento con  $\alpha$ -amanitina. El paso siguiente fue tratar las células con formaldehído 1,5 % por 10 minutos a temperatura ambiente, este proceso une las proteínas al ADN. Las células fueron

lavadas con PBS frío suplementado con inhibidor de proteasa, colectadas de forma mecánica en un tubo de 1,5 mL estéril y luego centrifugadas por 5 minutos a 2000 g a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 500 µL de buffer de lisis e incubado por 10 minutos a 4 °C. Luego, este homogenato fue sonificado en hielo por un minuto tres veces para romper el ADN empleando el sonicador Microson XL 2000 en nivel cuatro (10-11 watts). El homogenato se centrifuga a 13000 g por 10 minutos a 4 °C y se toma el sobrenadante el cual se diluye 10 veces en buffer para inmunoprecipitación (IP), 50 µL de ésta fracción fue reservada para usar como control de carga de la muestra. Antes de la inmunoprecipitación con los anticuerpos específicos la muestra se incubó por 30 minutos a 4 °C y agitación con 150 µL de una mezcla de esperma de salmón/proteína A-sefarosa (que contiene 30 µg de esperma de salmón sonificado, 75 µg de BSA y 225 µg de proteína A sefarosa). Luego la muestra fue centrifugada y el sobrenadante es incubado toda la noche con los anticuerpos específicos (ver tabla abajo) con rotación a 4 °C, se empleó como control negativo un anticuerpo policlonal anti IgG hecho en conejo (abcam, Cat # ab171870). Los anticuerpos fueron unidos a la sefarosa mediante el kit Pierce (Thermo-Fisher, cat # 44990). Los complejos ADN-proteína fueron recuperados incubando con 120 µL de la mezcla esperma de salmón/proteína A-sefarosa por 3 horas a 4 °C y rotación. Las muestras se centrifugaron suavemente (70 g) y el pellet fue lavado de forma seriada utilizando 300 µL de los buffers de lavado 1, 2 y 3. Finalmente se lavó dos veces con el buffer TE (250 mM Tris-HCl a pH 8, 5 mM EDTA). Los complejos precipitados fueron separados de las esferas de sefarosa realizando tres incubados secuenciales de 10 minutos con 50 µL de SDS 1 % en bicarbonato de sodio 0.1 M. Luego la unión entre las proteínas y el ADN producida por el formaldehído fue revertida incubando las muestras a 65 °C toda la noche. Finalmente, el ADN fue purificado usando columnas Qiaquick (Qiagen) y se procedió al subsecuente análisis por RT-qPCR utilizando 1 µL del control de carga y 3 µL de la inmunoprecipitación procediendo como se describe en el apartado “PCR cuantitativa en tiempo real”. Los cebadores fueron diseñados con el programa File Builder v3.1 (AppliedBiosystem) de acuerdo a los sitios de unión de los promotores de los genes de *ciclina D1* y *c-Myc* descritos previamente por Nettles KW *et al.* y Nakshatri *et al.* [133, 134]. Los resultados obtenidos en este caso fueron calculados por el método veces de enriquecimiento con respecto al mock (IgG) mediante la fórmula  $2^{-(\Delta Ct)}$  donde  $\Delta Ct$  es  $Ct_{\text{mock}} - Ct_{\text{muestra}}$ .

**Tabla de anticuerpos usados para la IP**

Nombre	Origen	Dilución	Empresa	Cat #
ER alpha (HC-20)	Conejo pAc*	1:100	Santa Cruz	sc-543
NFkB p65 (F-6)	Ratón mAc <sup>♦</sup>	1:100	Santa Cruz	sc-8008
Stat3 (C-20)	Conejo pAc	1:100	Santa Cruz	sc-482
IgG	Conejo pAc	1 ug/mL	Abcam	ab171870
Histona H3 (tri methyl K4)	Conejo pAc	1 ug/mL	Abcam	ab8580
RNA Polimerasa II (8WG16)	Ratón pAc	1:100	Millipore	05-952
NCoR	Conejo pAc	1 ug/mL	Abcam	ab24552
CBP	Conejo pAc	1 ug/mL	ThermoFisher	PA5-27369
KAT13A/SRC1	Conejo pAc	1 ug/mL	Abcam	ab2859

\* pAc: Anticuerpo policlonal. ♦ mAc: Anticuerpo monoclonal.

### Cebadores TaqMan

GEN	Especie	Sitio de unión de NF-kB contenido en el amplicón	Dye	Amplicón
Promotor de <i>ciclina D1</i>	Humano	CTACA <u>GGGGAGT</u> TTTG	FAM-MGB	57
Promotor de <i>c-Myc</i>	Humano	ATTT <u>GGGGACACT</u> TCC	FAM-MGB	59

### Determinación de IL-6 y TNF- $\alpha$ en el medio de cultivo

La concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el medio de cultivo se cuantificó mediante ensayos de ELISA Ready-Set-Go eBioscience (Cat.# 88-7066 y 88-7346 respectivamente) siguiendo el protocolo estándar. Brevemente, se colocaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura en cada pocillo y se incubó toda la noche a 4 °C, luego se lava cada pocillo 5 veces con 250  $\mu$ L de buffer de lavado (0,05 % tween-20 en PBS 1X). Después de esto se incuban los pocillos con 200  $\mu$ L de buffer de bloqueo 1 h y se vuelven a realizar 5 lavados con buffer de lavado. Hecho esto se colocan 100  $\mu$ L de las muestras a medir y de las diluciones correspondientes de la solución estándar para realizar la curva de calibración incubando 2 h a temperatura ambiente. Luego se

efectúan nuevamente 5 lavados con el buffer correspondiente antes de incubar 1h con 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan otros 5 lavados, se agrega a cada pocillo 100  $\mu$ L de avidina-HRP 1X y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizan 7 lavados antes de agregar 100  $\mu$ L de la solución substrato tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo e incubar 15 minutos. Finalmente se agrega 50  $\mu$ L de la solución Stop a cada pocillo y se lee la absorbancia a 450 nm.

### **Determinación de IL-6 en muestras de tejido**

La concentración de IL-6 fue determinada mediante el “Human IL-6 ELISA Kit” (Invitrogen Cat # KHC0061) siguiendo el protocolo estándar. Brevemente, las muestras fueron mantenidas a -80 °C hasta el experimento. Se tomó una porción de tejido de aproximadamente 100 mg y se homogeneizó en un homogeneizador Dounce con 500  $\mu$ L de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Tritón X-100, 1 mM NaF, 20 mM pirofosfato de sodio, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 % glicerol, 0.1% SDS y 0,5 % deoxicolato) enfriado con hielo más 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y cocktail de inhibidor de proteasa y luego se sonicó a 30 KHz durante 10 segundos dos veces manteniendo la muestra siempre en hielo. Luego el lisado se incubó en hielo 30 minutos agitando vigorosamente cada 10 minutos. Después de este paso las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron diluidas 1:10 o 1:100, se tomaron 100  $\mu$ L de cada muestra y se colocaron en los pocillos correspondientes junto con 50  $\mu$ L de anticuerpo anti IL-6 conjugado a biotina excepto en el blanco y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Luego se hicieron 4 lavados y se agregó 100  $\mu$ L de solución 1X de estreptavidina conjugada con la peroxidasa de rabanito (HRP) excepto en el blanco y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 4 lavados nuevamente, se agregó 100  $\mu$ L del estabilizador de cromógeno tetrametilbencidina (TMB) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se agregó 100  $\mu$ L de solución Stop a cada pocillo (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la absorbancia a 450 nm.

### **Determinación de p-STAT3 y p-ERK-1**

La concentración de p-STAT3 y p-ERK-1 fue determinada mediante PathScan Phospho-STAT3 (Tyr 705) Sandwich ELISA (Cat # 7146, Cell Signaling) y PathScan Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Sandwich ELISA (Cat # 7177, Cell Signaling) respectivamente siguiendo el protocolo del fabricante.

#### Anticuerpos utilizados:

Para la determinación de p-STAT3, se utilizó un anticuerpo de captura anti STAT3 (origen conejo), un anticuerpo de detección anti p-STAT3 (Tyr 705) (origen ratón) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a HRP.

Para la determinación de p-ERK-1 (p44-MAPK), se utilizó un anticuerpo de captura anti p-44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (origen conejo), un anticuerpo de detección anti p-44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (origen ratón) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a HRP.

#### Protocolo:

Preparación de lisados celulares para células adherentes: Retirar el medio y enjuagar las células una vez con PBS helado. Agregar 0,5 mL de buffer de lisis celular (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM glicerofosfato-beta, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptin) frío más 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a cada placa (10 cm de diámetro) e incubar la placa en hielo durante 5 min. Raspar las células de la placa, sonicar el lisados en hielo y luego centrifugar durante 10 minutos (x14,000 rpm) a 4 °C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Almacenar a -80 °C en alícuotas de un solo uso.

Recubrimiento del pocillo: Enjuagar la placa de 96 pocillos con 200 µl de dH<sub>2</sub>O y descartar el líquido. Diluir el anticuerpo de captura 1:100 en PBS 1X, mezclar bien y agregar 100 µl por pocillo. Cubrir la placa e incubar durante la noche a 4 °C (17-20 h).

Lavado: Desechar el contenido de la placa en un receptáculo. Lavar cuatro veces con buffer de lavado (PBS 1X, 0,05 % Tween 20), 200 µl cada vez por pocillo. Evitar que los pocillos no se sequen por completo en ningún momento.

Bloqueo de la placa: Añadir 150 µl de buffer de bloqueo (PBS 1X, 0,05 % Tween 20, 1 % albúmina de suero bovino-BSA) por pocillo, cubrir la placa e incubar a 37 °C durante 2 h. Después del bloqueo, lavar la placa como se indica en “Lavado”.

Análisis de la muestra: Los lisados se pueden usar sin diluir o diluidos en buffer de

bloqueo. Se añaden 100 µl de lisado por pocillo. Cubrir la placa e incubar a 37 °C durante 2 horas. Lavar la placa como en “Lavado”. Diluir el anticuerpo de detección 1:100 en buffer de bloqueo. Agregar 100 µl por pocillo. Cubrir la placa e incubar a 37 °C durante 1 hora. Lavar nuevamente la placa como en “Lavado”. El anticuerpo secundario, ya sea estreptavidina anti-ratón o anti-conejo-HRP, se diluye 1:1000 en buffer de bloqueo. Agregar 100 µl por pocillo, cubrir e incubar a 37 °C durante 30 min. Lavar nuevamente la placa como en “Lavado”. Agregar 100 µl de sustrato de peroxidasa de rabanito (HRP) tetrametilbencidina (TMB) por pocillo, cubrir e incubar a 37 °C durante 10 min. Finalmente agregar 100 µl de solución STOP (ácido sulfúrico 2N) por pocillo y agitar suavemente por unos segundos.

Determinación espectrofotométrica: limpiar la parte inferior de los pozos con un paño sin pelusa y leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos después de agregar la solución STOP.

### **Determinación de p-ERα (S118) por ELISA**

La concentración de p-ERα (S118) se determinó mediante el kit Mouse/Human Phospho-ER Alpha / Estrogen Receptor (Ser118) ELISA Kit (Cell-Based Phosphorylation ELISA) (LSBio Cat # LS-F1503).

Protocolo:

Preparación de las células: Sembrar 200 µl de 20,000 células adherentes en medio de cultivo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Incubar las células durante la noche a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Luego las células son tratadas según cada experimento. Retirar el medio de cultivo y enjuagar con 200 µl de buffer TBS 1x (100 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05 % tween 20), dos veces.

Fijado de las células: incubar con 100 µl de solución de fijación (Formaldehído 4% en TBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Retirar la solución de fijación y lavar la placa 3 veces con 200 µl de buffer de lavado (TBS 1X, 0,05 % Tween 20) durante cinco minutos cada vez (Lavado). La placa se puede almacenar a 4 °C por una semana.

Bloqueado de las células: Agregar 100 µl de buffer de extinción e incube durante 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier peroxidasa endógena. Lavar como en el paso anterior “Lavado”. Luego Agregar 200 µl de buffer de bloqueo (TBS 1X, 0,05 % Tween 20, 1 % albúmina de suero bovino-BSA) e incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Lavar como en “Lavado”.

Análisis de las células: Agregar 50 µl de anticuerpos primarios 1x anti ER-α (Phospho-

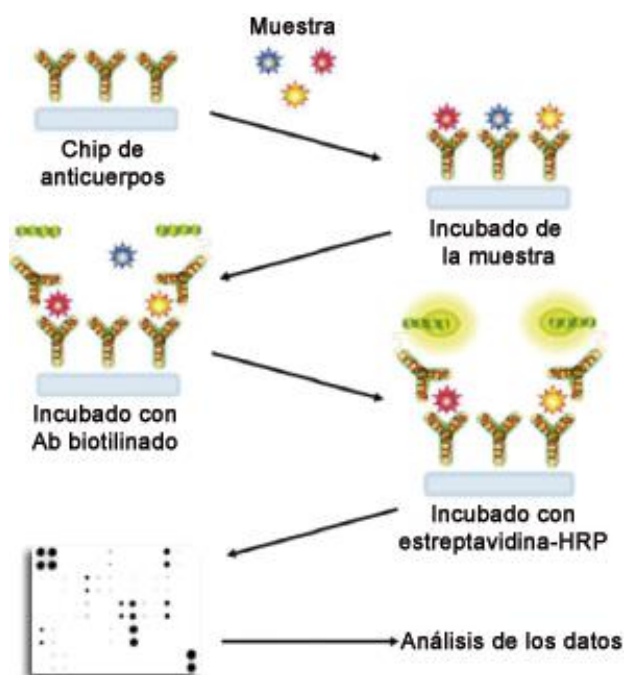
Ser118), o Anticuerpo Anti-GAPDH como control interno a los pocillos correspondientes, cubrir con Parafilm e incubar durante 16 horas (toda la noche) a 4 °C. Lavar como en “Lavado”. Luego agregar 50 µl de anticuerpos secundarios anti IgG de conejo o anti IgG de ratón conjugado con HRP (peroxidasa de rabanito) a los pocillos correspondientes e incubar durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Nota: Agregar Anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con HRP en los pocillos incubados con anticuerpo anti-ER- $\alpha$  (Phospho-Ser118) (policlonal, origen conejo) y agregar anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con HRP a los pocillos incubado con anticuerpo Anti-GAPDH (monoclonal, origen ratón).

Determinación espectrofotométrica: Lavar como en “Lavado”. Agregar 50 µl de sustrato de HRP TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) listo para usar a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Luego agregar 50 µl de solución STOP (ácido sulfúrico 2N) a cada pocillo y leer OD a 450 nm usando inmediatamente el lector de microplacas.

### Array de anticuerpos

El análisis global de los niveles de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas fue evaluado mediante una matriz de anticuerpos (RayBio Human Cytokine Antibody Array 5) y cuantificado utilizando el programa libre ImageJ.

Protocolo del ensayo



1. Bloqueo: con solución de bloqueo incubar durante 30 minutos a temperatura

ambiente.

2. Incubado de la muestra: Pipetear 1 mL de muestra sin diluir en cada pocillo e incubar 3 horas a temperatura ambiente.

3. Primer lavado: Pipetear 2 mL del buffer de lavado I en cada pocillo e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Repetir esto 2 veces más para un total de 3 lavados. Pipetear 2 mL del buffer de lavado II en cada pocillo e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Repetir esto 1 vez más para un total de 2 lavados.

4. Incubado con el cóctel de anticuerpos biotinilados: Pipetear 1 mL del cóctel de anticuerpos biotinilados preparado en cada pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C.

5. Segundo lavado: Lavar las membranas como se indica en el paso 3.

6. Incubado con HRP-Estreptavidina: Pipetear 2 mL de HRP-estreptavidina en cada pocillo e incubar durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C.

7. Tercer lavado: Lavar las membranas como se indica en el paso 3.

8. Detección de quimioluminiscencia: Transferir las membranas, con la cara impresa hacia arriba, sobre una hoja de papel de cromatografía, papel de seda o papel secante sobre una superficie plana. Eliminar cualquier exceso de buffer de lavado tocando los bordes de la membrana con otra hoja de papel. Transferir las membranas, con la cara impresa hacia arriba, sobre una lámina de plástico sobre una superficie plana. En un solo tubo limpio, pipetear volúmenes iguales (1:1) del buffer de detección C y el Buffer de Detección D. Mezclar bien con una pipeta. EJEMPLO: 250 µL de tampón de detección C + 250 µL de tampón de detección D = 500 µL (suficiente para 1 membrana). Con cuidado, pipetear 500 µL de la mezcla del buffer de detección en cada membrana e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitar.

NOTA: idealmente, este paso debe completarse dentro de 10-15 minutos ya que las señales de quimioluminiscencia se desvanecerán con el tiempo.

Coloque otra lámina de plástico en la parte superior de las membranas comenzando en un extremo y "balanceando" suavemente la lámina de plástico flexible sobre la superficie hasta el extremo opuesto eliminando cualquier burbuja de aire. Transferir las membranas al sistema de obtención de imágenes de quimioluminiscencia y exponer.

9. Controles internos:

Control positivo: Pocillo con cantidad controlada de anticuerpo biotinilado impreso en la matriz. Usado para la normalización y para orientar las matrices.

Puntos de control negativos: Pocillos sin anticuerpos. Usado para determinar el nivel de



unión no específica de las muestras.

Puntos en blanco: nada está impreso aquí. Usado para medir el fondo.

#### 10. Análisis de datos:

Una vez que se extraen los datos de densitometría numérica sin procesar, el fondo debe restarse y los datos deben normalizarse a las señales de los Controles positivos para su análisis.

Resta del fondo: Si el fondo es bastante uniforme en toda la membrana, los puntos de control negativo y los puntos en blanco deben ser similares.

Normalización de control positivo: la cantidad de anticuerpo biotinilado impreso para cada Punto de control positivo es consistente de una matriz a otra. Como tal, la intensidad de estas señales de control positivo se puede utilizar para normalizar las señales y comparar los resultados en múltiples matrices.

### **Experimento *in vivo* con ratones**

Todos los estudios y procedimientos realizados en los ratones fueron supervisados por el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de Córdoba y fueron hechos en concordancia con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) (<http://www.fcq.unc.edu.ar/cicual>). Los ratones hembra Nude (o desnudos) (Crl: NU/NU-Foxn1<sup>nu</sup>) fueron comprados a la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Facultad de la Plata con 3 semanas de edad. Estos ratones fueron criados en condiciones adecuadas libre de patógenos en un ambiente con aire filtrado. El lecho de marlo molido autoclavado se cambió semanalmente. La comida de los animales fue esterilizada por UV y el agua autoclavada. Para formar los tumores de xenoinjerto las células de cáncer de mama humanas fueron inyectadas solas o junto con monocitos en una relación 3:1 en una solución 1:1 de PBS y Matrigel (Becton Dickinson). La solución de células y Matrigel fue inyectada en el flanco trasero derecho de los animales de forma subcutánea y el volumen total inyectado fue de 50  $\mu$ L. Un día antes de inyectar las células, a todos los ratones se les colocó una cápsula subcutánea de liberación lenta de estradiol de 0,72 mg/60 días (Innovative Research of America). Los tumores crecieron de forma libre sin ningún tipo de intervención hasta que alcanzaron un volumen entre 450 y 500 mm<sup>3</sup> punto en el cual se comenzó con los diferentes tratamientos. El volumen de los tumores se midió cada 4 o 5 días (según se aclara en cada experimento) utilizando un calibre

digital de precisión. Para calcular el volumen se realizaron dos medidas, una del diámetro más largo (L) y otra del diámetro más corto (S) y el volumen en mm<sup>3</sup> se obtuvo aplicando la fórmula  $\frac{\pi}{6} \times L \times S^2$ .

### SDS-PAGE y Western Blot

La corrida electroforética se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. Se siguió el mismo protocolo básico detallado en “SDS-PAGE y Western Blot del capítulo 2”. En el caso de analizar proteínas fosforiladas al preparar los homogenatos se adicionó un inhibidor de fosfatasa (PhosStop, Roche) además del inhibidor de proteasa y el bloqueo de la membrana antes del incubado con los anticuerpos primarios se realiza con BSA al 5 % en PBS o con SuperBlock T20 (ThermoFisher) y no con leche descremada. Se usaron anticuerpos primarios contra ER $\alpha$  (Cell Signaling Cat # 2512), Fosfo-S118 ER $\alpha$  (Abcam Cat # ab32396). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron producidos en cabra contra conejo o ratón y biotilados. Como forma de revelado se utilizó peroxidasa de rabanito (HRP) conjugada a estreptavidina (GE Healthcare cat # RPN1231) y ECL plus (GE Healthcare) siguiendo el protocolo normal sin modificaciones.

### Tabla de anticuerpos utilizados

<b>Primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>Cat #</b>
ER alpha (62A3)	Ratón mAc <sup>♦</sup>	1:1000	Cell Signaling	2512
p-ER-alpha S118	Conejo mAc	1:1000	Abcam	ab32396
Receptor IL-6 (B-R6)	Ratón mAc	1 ug/mL	ThermoFisher	AHR0061
<b>Secundarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>Cat #</b>
Anti conejo-biotina	Cabra	1:20000	ThermoFisher	31820
Anti ratón-biotina	Cabra	1:20000	ThermoFisher	31800
Estreptavidina-HRP		1:50000	Sigma	GERPN1231

♦ mAc: Anticuerpo monoclonal.

### Análisis estadístico

Los datos en los gráficos de este trabajo de tesis son presentados como el promedio de las mediciones con su respectivo error estándar de la media (SEM). En general se hicieron un mínimo de tres experimentos independientes. El número específico de la cantidad de datos utilizados para la estadística se especifica en la leyenda de cada figura

junto con el tipo de análisis implementado. En el caso de los resultados de RT-qPCR, fueron tomados como significativos aquellos valores que su  $\log_2$  lograban superar el valor absoluto de 0.15 y se procedió con el análisis estadístico. Todos los gráficos fueron realizados empleando el software GraphPad Prism versión 5.01.

## Capítulo 2

### Experimento *in vivo* con ratones

Todos los estudios y procedimientos realizados en los ratones fueron supervisados por el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de Córdoba y fueron hechos en concordancia con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Los ratones hembra Nude (o desnudos) (Crl: NU/NU-Foxn1<sup>nu</sup>) fueron comprados a la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Facultad de la Plata con 3 semanas de edad. Estos ratones fueron criados en condiciones adecuadas libre de patógenos en un ambiente con aire filtrado. El lecho de marlo molido autoclavado se cambió semanalmente. La comida de los animales fue esterilizada por UV y el agua autoclavada. Los ratones Nude hembras fueron inyectados en la almohadilla grasa de la mama inguinal izquierda con 50  $\mu$ L de ácido oxálico 810  $\mu$ M en solución vehículo conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM, en estas condiciones el oxalato precipita en forma de microcristales de oxalato de calcio (grupo experimental). Como controles ratones fueron inyectados en la misma zona con ácido acético 810  $\mu$ M en solución vehículo o solamente con solución vehículo. Los animales recibieron un total de 9 dosis en un período de 29 días (una inyección cada 3 o 4 días). Para evitar la formación de microcristales de oxalato en la solución a inyectar, en otro experimento se utilizó oxalato de potasio 810  $\mu$ M en solución vehículo. El oxalato de potasio es altamente soluble y no forma cristales a esta concentración. En este caso los ratones fueron inyectados en la almohadilla grasa de la mama inguinal izquierda o en el muslo derecho de forma subcutánea con dicha solución de oxalato de potasio. Como controles, ratones fueron inyectados en las mismas zonas de forma subcutánea solamente con solución vehículo. Los animales en este caso recibieron un total de 7 dosis de 50  $\mu$ L cada una en un período de 18 días (una inyección cada 2 o 3 días). El volumen de los tumores se determinó utilizando un calibre digital de precisión. Para calcular el volumen se realizaron dos medidas, una del diámetro más largo (L) y otra del diámetro más corto (S) y el volumen en  $\text{mm}^3$  se obtuvo aplicando la fórmula  $0,4 \times L \times S^2$  de Attia y Weiss [222]. Los ratones fueron sacrificados teniendo en cuenta el estado de salud general del animal basados en aspectos éticos establecidos (<http://www.fcq.unc.edu.ar/cicual>) como la observación de comportamientos anómalos y características que indican sufrimiento, a saber: falta de apetito y movilidad, cuartos

traseros caídos o señales físicas como pérdida de peso con tendencia negativa marcada, y piel con indicios de deshidratación.

### **Obtención de muestras humanas, aspectos legales y éticos**

Las muestras de tumores de mama humanos recién extirpados y pequeñas cantidades de muestras de tejido sano circundante fueron obtenidas de pacientes mujeres después de que se les informó sobre todo el proceso y se firmara el consentimiento de que aceptaba participar en este estudio (consentimiento informado). La Comisión de Ética en Investigación del Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, aprobó todos los procedimientos utilizados para este estudio (con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983). Todas las muestras se procesaron de forma anónima y las edades de las pacientes oscilaron entre 38 y 82 años.

### **Macrodissección de las muestras de tejido**

Este proceso fue realizado por un patólogo especializado en mama, el Dr. Hugo H. Cejas, quien fue Profesor Titular a cargo del servicio de anatomía patológica del Hospital Misericordia de Córdoba. Para la macrodissección se realizaron cortes de 10 µm de espesor que fueron adheridas a un portaobjetos de vidrio sin carga en series de 3 a 5 cortes por vidrio utilizando agua libre de nucleasas. También se colocó un corte adicional por vidrio de la sección adyacente al tumor. Estos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) y el patólogo determinó las regiones tumorales. Posteriormente se tomaron muestras de tejido de la zona tumoral y de la zona circundante adyacente al tumor mediante el raspaje con un bisturí. Estas muestras se colocaron en tubos estériles para posteriores análisis de proteína u oxalato total.

### **Inmunohistoquímica**

Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados como se describe en Gil. GA *et al* 2012 [206], brevemente las muestras fueron tratadas con xileno por 10 min dos veces, luego se lavaron 5 minutos en etanol absoluto 100% y sucesivos lavados de 2 minutos con soluciones con cantidades decrecientes de alcohol, a saber 95%, 90%, 80% y 70%. Luego los cortes fueron tratados con solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6) para reactivar epítopes antigénicos. Los cortes fueron incubados 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (BSA 5 % y Tween-20 0,1 % en PBS 10 mM) y posteriormente fueron incubados toda la noche a 4 °C con anticuerpo anti c-Fos hecho

en conejo (Sigma, Cat # F7799) diluido 1:300 en solución de bloqueo. Los cortes fueron lavados 3 veces con solución de Tween-20 0,1 % en PBS 10 mM (PBS-tween) y luego incubados con anticuerpo secundario anti conejo Alexa 488 diluido 1:500 en PBS-tween por 2 h a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-tween y los núcleos fueron teñidos incubando con solución 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1X por 20 minutos y lavando nuevamente con agua Milli-Q. Los cortes fueron montados utilizando FluorSave (Calbiochem) y analizados con los microscopios confocales Olympus FV1000 o Pascal 5. Las imágenes fueron procesadas con los softwares de Olympus o Carl Zeiss.

La tinción inmunohistoquímica de los cortes para vimentina, proteína S100, antígeno sérico mamario (MSA) y las citoqueratinas E1 y E3 fue realizada por la patóloga Ana Martin (M.P. 873) mediante el método biotina-estreptavidina. Brevemente, luego de la recuperación antigénica los cortes fueron incubados con solución de bloqueo 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4 °C (ver tabla abajo). Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS 1X e incubados con anticuerpo secundario biotinilado anti ratón o anti conejo por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS, se incubó con estreptavidina-HRP y finalmente se reveló la actividad peroxidasa mediante el substrato 3,3 diaminobencidina (DAB).

**Tabla de anticuerpo utilizados**

<b>Primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>Cat #</b>
Vimentina	Ratón mAc <sup>♦</sup>	1:1000	ThermoFisher	MA3-745
AE1/AE3	Ratón mAc	1:10	Abcam	ab27988
ST3GAL5 (MSA)	Conejo pAc*	1:100	ThermoFisher	PA5-30289
S100	Conejo pAc	1:100	Abcam	ab868
<b>Secundarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>Cat #</b>
Anti conejo-biotina	Cabra	1:20000	ThermoFisher	31820
Anti ratón-biotina	Cabra	1:20000	ThermoFisher	31800
Estreptavidina-HRP		1:50000	Sigma	GERPN1231

♦ mAc: Anticuerpo monoclonal. \* pAc: Anticuerpo policlonal.

### **Determinación de oxalato**

El tejido mamario humano o murino fue procesado en ácido clorhídrico 2,75 M utilizando un homogeneizador eléctrico (Ultra-turrax). Siempre se mantuvo la misma proporción 1:5 entre los miligramos de tejido y los microlitros de ácido clorhídrico, aproximadamente para 200 mg de tejido mamario (ya sea tumoral o normal) se homogeneizó en 1000 µL de ácido clorhídrico. Luego este homogenato fue centrifugado por 15 minutos a 15000 g y la fracción sobrenadante (SF) se almacenó a -20 °C. La concentración de oxalato total en las SF fue cuantificada por medio de electrocromatografía capilar (CEC, Beckman Coulter).

### **Cultivos celulares**

Células MCF-7, MDA-MB231, MCF-10A, NIH/3T3 y HEK-293 (ATCC-Bethesda, MD, USA) fueron crecidas en condiciones estándar de cultivo. Todas las células, excepto las MCF-10A, se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Gibco) más antibiótico PSN 1X (ThermoFisher). Para el cultivo de las células MCF-10A se empleó DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 10 % de FBS (Gibco), 20 ng/mL del factor de crecimiento epidérmico (EGF), 0,5 mg/mL de hidrocortisona (Sigma), 100 ng/mL de toxina colérica (Sigma) y 10 µg/mL de insulina humana (NovoRapid FlexPen). Una vez alcanzada la confluencia deseada (70-90 % dependiendo del experimento) el arresto del ciclo celular se logró manteniendo a las células en medio básico sin el suplemento de FBS por 48 horas, excepto para el caso de las células MDA-MB231 que se necesitó de 72 horas. Luego las células reingresaron al ciclo celular mediante la adición de FBS al 10 % o en su defecto continuaron siendo cultivadas sin FBS según se detalla en cada experimento.

### **Homogenatos celulares para análisis de proteína**

Luego que las células fueron crecidas hasta la confluencia deseada en placas de 35 mm, se extrajo el medio de cultivo y las mismas fueron lavadas con buffer fosfato 1X pH 7,4 (PBS). Después de esto, se lisaron las células empleando 90 µL de buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, Tritón 1 % y SDS 0,1 %) con inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche). El homogenato obtenido fue centrifugado a 15000 g para separar la fracción sobrenadante (SF) de la microsomal manteniendo siempre las muestras a 4 °C. Finalmente la SF se almacenó a -20 °C para posteriores análisis por

---

## SDS-PAGE y Western Blot.

### **Homogenato de tejido para análisis de proteína**

El tejido mamario humano o murino fue procesado en buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, Tritón 1 % y SDS 0,1 %) más inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche) utilizando un homogeneizador eléctrico (Ultra-turrax). Este proceso se realizó en hielo a 4 °C y siempre se mantuvo la misma proporción 1:5 entre los miligramos de tejido y los microlitros de buffer. Luego el homogenato fue centrifugado a 15000 g por 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4 °C para separar la fracción sobrenadante (SF) de la microsomal (MF). Finalmente la SF se almacenó a -20 °C para posteriores análisis por SDS-PAGE y Western Blot.

### **Cuantificación de proteínas**

La concentración total de proteínas presente en la fracción sobrenadante del homogenato total obtenido a partir de células o de tejido (para más detalles ver los dos títulos anteriores) se cuantificó utilizando el método colorimétrico estándar de Bradford (Bio-Rad).

### **SDS-PAGE y Western Blot**

La corrida electroforética se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. La relación entre acrilamida y bisacrilamida fue de 29,2 % y 0,8 % respectivamente y la concentración final de duodecilsulfato de sodio (SDS) en el gel fue de 0,1 % p/v. Fueron sembrados 60 µg de proteína total de la SF obtenida a partir de tejido o de células (para más detalles ver arriba preparación de homogenatos) en cada carril la cuales fueron mezcladas previamente con buffer Laemmli (Bio-Rad) y hervidas por 5 minutos. Las proteínas separadas por su peso molecular fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Westran S de Sigma) con un tamaño de poro de 0,2 µm empleando una corriente de 300 mA por 1 hora de acuerdo a lo que describe Anthony K. Tan. Para la inmunomarcación, los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados incubando la membrana en una solución de PBS con leche descremada al 5 % y Tween 20 al 0,05 % p/v por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana bloqueada luego se incubó toda la noche (12-16 horas aproximadamente) a 4 °C con los anticuerpos primarios en PBS-Tween 20 0,05 % p/v a las concentración que se detallan a continuación. Anticuerpo policlonal de conejo anti c-Fos (Sigma, cat



F7799) dilución 1/1000, anticuerpo policlonal de conejo anti c-Jun (SantaCruz sc-45) dilución 1/1000, anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\alpha$ -tubulina DM1A (Sigma, cat T9026) dilución 1/5000. Luego de lavar las membranas con PBS para retirar los anticuerpos primarios no unidos, la misma se incubó por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios IRDye 680LT (LI-COR) anti conejo y con IRDye 800CW (LI-COR) anti ratón, ambos a una dilución de 1/25000. Finalmente se realizan tres lavados de la membrana con PBS y se procede a su revelado empleando el dispositivo de imagen infrarroja ODYSSEY (LI-COR).

**Tabla de anticuerpos utilizados**

<b>Primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>Cat #</b>
c-Fos	Conejo pAc*	1:1000	Sigma	F7799
c-Jun	Conejo pAc	1:1000	Santa Cruz	sc-45
alpha-Tubulina (DM1A)	Ratón mAc♦	1:5000	Sigma	T9026
<b>Secundarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>	<b>IRDye</b>
Anti conejo	Cabra	1:25000	LI-COR	680LT
Anti ratón	Cabra	1:25000	LI-COR	800CW

\* pAc: Anticuerpo policlonal. ♦ mAc: Anticuerpo monoclonal.

### **RT-PCR cuantitativa o en tiempo real**

El ARN total se extrajo de las muestras de tejido mamario o de las líneas celulares empleando Trizol (Invitrogen) o RNeasy Mni Kit (Quiagen) respectivamente. Un microgramo de ARN total fue retro-transcripto a ADNc utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen). Los cebadores Taqman para RT-qPCR fueron adquiridos de Applied Biosystems. Los cebadores utilizados para cuantificar los niveles de mRNA de *c-fos* humano y de ratón fueron Hs04194186\_s1 y Mm00487425\_m1 respectivamente. La expresión del gen *c-fos* humano fue normalizada utilizando el cebador contra GAPDH Hs99999905\_m1 en células MCF-7 o el cebador contra RPLPO Hs99999902\_m1 en células HEK-293. La expresión del gen *c-fos* de ratón fue normalizada utilizando el cebador contra Tbp Mm00446973\_m1. Las reacciones en tiempo real se realizaron empleando el equipo ABI 7500 Sequence Detection System y el análisis de los resultados se llevó a cabo con el software v1.4. La

expresión relativa de los genes fue calculada utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y cada muestra fue analizada por cuadruplicado.

**Tabla de cebadores TaqMan utilizados**

Gen	Especie	Código	Dye	Tamaño amplicón
<i>c-fos</i>	Humano	Hs04194186_s1	FAM-MGB	82
<i>c-fos</i>	Ratón	Mm00487425_m1	FAM-MGB	59
<i>RPLPO</i>	Humano	Hs99999902_m1	FAM-MGB	105
<i>GAPDH</i>	Humano	Hs99999905_m1	FAM-MGB	122
<i>Tbp</i>	Ratón	Mm00446973_m1	FAM-MGB	73

### Ensayo de proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular se realizaron de dos maneras diferentes, utilizando el kit de proliferación celular CyQuant (Molecular Probes) o contando las células con cámara de Neubauer de forma manual. El primer método comercial se basa en el uso de un colorante que se une al ADN. El colorante unido al ADN emite fluorescencia la cual es linealmente proporcional al número de células en el pocillo. Las células fueron sembradas en una placa para fluorescencia de 96 pocillos a una densidad de 4000 células por pocillo y cultivadas por 72 horas en las diferentes condiciones según se especifica en el experimento. Luego se procedió según el protocolo comercial estándar del kit. Brevemente, se lisaron las células 24 horas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  luego se les añadió el colorante y se midió la fluorescencia en un fluorómetro de placas. En el método manual, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 30000 células por pocillo. Las células fueron cultivadas por 72 horas en las diferentes condiciones y luego fueron tripsinizadas y contadas por triplicado en cámara de Neubauer. En todos los casos los ensayos fueron realizados tres veces por cuadruplicado.

### Análisis estadísticos

Cada uno de los análisis estadísticos aplicados a los resultados ha sido especificado en la correspondiente leyenda de cada figura. Las curvas de supervivencia (Fig. 29) fueron analizadas estadísticamente por el test LogRank (Mantel-Cox) [223]. Por otro lado, en las figuras 23a y 24 el análisis de significancia fue hecho empleando un ANOVA de dos vías con un post test de comparación múltiple de Holm Sidak's ( $\alpha = 0,05$ ). En las

---

figuras 23b, 26c, 26d y 33b se utilizó un ANOVA de una vía con un post test de Holm Sidak's. Las figuras 22, 30 y 31 fueron analizadas estadísticamente aplicando un test de t de Student de dos colas. Todos los gráficos fueron realizados mediante empleando el software GraphPad Prism versión 5.01.

## Referencias Bibliográficas

1. Macias H, Hinck L: **Mammary gland development**. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2012, **1**(4):533-557.
2. Javed A, Lteif A: **Development of the human breast**. *Seminars in plastic surgery* 2013, **27**(1):5-12.
3. Folgueira MA, Maistro S, Katayama ML, Roela RA, Mundim FG, Nanogaki S, de Bock GH, Brentani MM: **Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series**. *Bioscience reports* 2013, **33**(6).
4. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
5. Li Q, Ingram L, Kim S, Beharry Z, Cooper JA, Cai H: **Paracrine Fibroblast Growth Factor Initiates Oncogenic Synergy with Epithelial FGFR/Src Transformation in Prostate Tumor Progression**. *Neoplasia* 2018, **20**(3):233-243.
6. Qin X, Yan M, Wang X, Xu Q, Wang X, Zhu X, Shi J, Li Z, Zhang J, Chen W: **Cancer-associated Fibroblast-derived IL-6 Promotes Head and Neck Cancer Progression via the Osteopontin-NF-kappa B Signaling Pathway**. *Theranostics* 2018, **8**(4):921-940.
7. San Martin R, Barron DA, Tuxhorn JA, Ressler SJ, Hayward SW, Shen X, Laucirica R, Wheeler TM, Gutierrez C, Ayala GE *et al*: **Recruitment of CD34(+) fibroblasts in tumor-associated reactive stroma: the reactive microvasculature hypothesis**. *The American journal of pathology* 2014, **184**(6):1860-1870.
8. Desmedt C, Salgado R, Fornili M, Pruneri G, Van den Eynden G, Zoppoli G, Rothe F, Buisseret L, Garaud S, Willard-Gallo K *et al*: **Immune Infiltration in Invasive Lobular Breast Cancer**. *Journal of the National Cancer Institute* 2018.
9. Bhowmick NA, Moses HL: **Tumor-stroma interactions**. *Current opinion in genetics & development* 2005, **15**(1):97-101.
10. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ: **Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumorigenesis**. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2005, **26**(4):173-185.
11. Tlsty TD, Coussens LM: **Tumor stroma and regulation of cancer development**. *Annual review of pathology* 2006, **1**:119-150.
12. Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K: **Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers**. *Nature genetics* 2005, **37**(8):899-905.
13. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A *et al*: **Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer**. *Nature medicine* 2008, **14**(5):518-527.
14. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC: **Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment**. *Breast cancer research : BCR* 2016, **18**(1):84.
15. Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ: **Targeting the tumor microenvironment**. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2007, **12**:3468-3474.
16. Udagawa T, Wood M: **Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention**. *Current opinion in pharmacology* 2010, **10**(4):369-374.
17. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L *et al*: **IL-6 and Stat3 are required for**

- survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer.** *Cancer cell* 2009, **15**(2):103-113.
18. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S *et al*: **gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis.** *Cancer cell* 2009, **15**(2):91-102.
  19. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L: **Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors.** *Cancer cell* 2005, **8**(3):211-226.
  20. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell* 2005, **121**(3):335-348.
  21. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B: **Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas.** *PLoS one* 2011, **6**(8):e23902.
  22. Stockmann C, Schadendorf D, Klose R, Helfrich I: **The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling.** *Frontiers in Oncology* 2014, **4**:69.
  23. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS: **The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment.** *Seminars in immunology* 2014, **26**(1):38-47.
  24. Rahir G, Moser M: **Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration.** *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2012, **61**(6):751-759.
  25. Disis ML: **Immune regulation of cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(29):4531-4538.
  26. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ: **Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.** *Science* 2011, **331**(6024):1565-1570.
  27. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ: **New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.** *Current opinion in immunology* 2014, **27**:16-25.
  28. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J: **The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.** *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(4):298-306.
  29. von Boehmer H, Daniel C: **Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer.** *Nature reviews Drug discovery* 2013, **12**(1):51-63.
  30. Frey DM, Drieser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, Oertli D, Kettelhack C, Terracciano L, Tornillo L: **High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients.** *International journal of cancer* 2010, **126**(11):2635-2643.
  31. Romaniuk A, Lsmall u CiUM: **Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression.** *Diagnostic pathology* 2015, **10**:79.
  32. Tang A, Dadaglio G, Oberkamp M, Di Carlo S, Peduto L, Laubretton D, Desrues B, Sun CM, Montagutelli X, Leclerc C: **B cells promote tumor progression in a mouse model of HPV-mediated cervical cancer.** *International journal of cancer* 2016, **139**(6):1358-1371.
  33. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P *et al*: **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.**

- Science* 2006, **313**(5795):1960-1964.
34. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhvani N, Keil SD, Junaid SA *et al*: **Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy**. *Cancer discovery* 2011, **1**(1):54-67.
  35. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Desmedt C *et al*: **Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial**. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2014, **25**(8):1544-1550.
  36. Verma C, Kaewkangsadan V, Eremin JM, Cowley GP, Ilyas M, El-Sheemy MA, Eremin O: **Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery**. *Journal of translational medicine* 2015, **13**:180.
  37. Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K: **Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer**. *British journal of cancer* 2007, **97**(8):1135-1138.
  38. Fang Z, Wen C, Chen X, Yin R, Zhang C, Wang X, Huang Y: **Myeloid-derived suppressor cell and macrophage exert distinct angiogenic and immunosuppressive effects in breast cancer**. *Oncotarget* 2017, **8**(33):54173-54186.
  39. Tagliabue A, Mantovani A, Kilgallen M, Herberman RB, McCoy JL: **Natural cytotoxicity of mouse monocytes and macrophages**. *Journal of immunology* 1979, **122**(6):2363-2370.
  40. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: **Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes**. *Trends in immunology* 2002, **23**(11):549-555.
  41. Mantovani A, Sica A: **Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity**. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(2):231-237.
  42. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S: **Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density**. *Oncology reports* 2005, **14**(2):425-431.
  43. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: **Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma**. *Cancer research* 1996, **56**(20):4625-4629.
  44. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M: **Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors**. *Cancer science* 2014, **105**(1):1-8.
  45. Biswas SK, Mantovani A: **Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm**. *Nature immunology* 2010, **11**(10):889-896.
  46. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS: **The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology**. *Histology and histopathology* 2018, **33**(2):133-145.
  47. Caux C, Ramos RN, Prendergast GC, Bendriss-Vermare N, Menetrier-Caux C: **A Milestone Review on How Macrophages Affect Tumor Growth**. *Cancer research* 2016, **76**(22):6439-6442.
  48. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC: **Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy**. *NPJ breast cancer* 2016, **2**.
  49. Mantovani A: **The chemokine system: redundancy for robust outputs**. *Immunology today* 1999, **20**(6):254-257.

50. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A: **Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression.** *Journal of cellular physiology* 2013, **228**(7):1404-1412.
51. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: **The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies.** *The Journal of pathology* 2002, **196**(3):254-265.
52. Condeelis J, Pollard JW: **Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis.** *Cell* 2006, **124**(2):263-266.
53. Bolli E, Movahedi K, Laoui D, Van Genderachter JA: **Novel insights in the regulation and function of macrophages in the tumor microenvironment.** *Current opinion in oncology* 2017, **29**(1):55-61.
54. Guo X, Zhao Y, Yan H, Yang Y, Shen S, Dai X, Ji X, Ji F, Gong XG, Li L *et al*: **Single tumor-initiating cells evade immune clearance by recruiting type II macrophages.** *Genes & development* 2017, **31**(3):247-259.
55. Li S, Xu F, Zhang J, Wang L, Zheng Y, Wu X, Wang J, Huang Q, Lai M: **Tumor-associated macrophages remodeling EMT and predicting survival in colorectal carcinoma.** *Oncimmunology* 2018, **7**(2):e1380765.
56. Weagel E SC, Liu PG, Robison R, O'Neill K **Macrophage Polarization and Its Role in Cancer.** *J Clin Cell Immunol* 2015, **6**(338).
57. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M: **Immunity, inflammation, and cancer.** *Cell* 2010, **140**(6):883-899.
58. Burke F, Relf M, Negus R, Balkwill F: **A cytokine profile of normal and malignant ovary.** *Cytokine* 1996, **8**(7):578-585.
59. Balkwill F, Mantovani A: **Inflammation and cancer: back to Virchow?** *Lancet* 2001, **357**(9255):539-545.
60. Tricot G: **New insights into role of microenvironment in multiple myeloma.** *Lancet* 2000, **355**(9200):248-250.
61. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N *et al*: **Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.** *Nature* 2000, **404**(6776):398-402.
62. Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A: **The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma.** *Journal of leukocyte biology* 2000, **67**(1):53-62.
63. Karin M: **Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression.** *Nature* 2006, **441**(7092):431-436.
64. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D: **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(1):41-51.
65. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A: **Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.** *Carcinogenesis* 2009, **30**(7):1073-1081.
66. Chen P, Bonaldo P: **Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies.** *International review of cell and molecular biology* 2013, **301**:1-35.
67. Nguyen DX, Bos PD, Massague J: **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(4):274-284.
68. Balkwill F: **Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?** *Cytokine & growth factor reviews* 2002, **13**(2):135-141.
69. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr.: **Stat3 as an oncogene.** *Cell* 1999, **98**(3):295-303.
70. Grivennikov SI, Karin M: **Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer.** *Cytokine & growth factor reviews* 2010, **21**(1):11-19.

71. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B: **Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(2):425-430.
72. Bollrath J, Greten FR: **IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis.** *EMBO reports* 2009, **10**(12):1314-1319.
73. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.** *Cell* 2001, **104**(4):487-501.
74. Hehlhans T, Pfeffer K: **The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.** *Immunology* 2005, **115**(1):1-20.
75. Perner L: **Host-tumor antagonism. XV. The apparently beneficial effects of acute concurrent infections or of toxin therapy on the course of malignant melanoma.** *Journal of the American Geriatrics Society* 1960, **8**:378-397.
76. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Jr., Shepard HM: **Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.** *Science* 1985, **230**(4728):943-945.
77. Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J, Fiers W: **Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons.** *Cancer research* 1986, **46**(8):3990-3993.
78. Wallach D: **Preparations of lymphotoxin induce resistance to their own cytotoxic effect.** *Journal of immunology* 1984, **132**(5):2464-2469.
79. Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F, Balkwill FR: **Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium.** *Molecular cancer therapeutics* 2006, **5**(2):382-390.
80. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D: **On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease.** *Immunological reviews* 1999, **169**:175-194.
81. Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris AL, Lewis CE: **Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma.** *British journal of cancer* 1998, **77**(12):2246-2251.
82. Parameswaran N, Patial S: **Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages.** *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2010, **20**(2):87-103.
83. Balkwill F: **Tumour necrosis factor and cancer.** *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(5):361-371.
84. Naugler WE, Karin M: **The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer.** *Trends in molecular medicine* 2008, **14**(3):109-119.
85. Rose-John S: **IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6.** *International journal of biological sciences* 2012, **8**(9):1237-1247.
86. Silver JS, Hunter CA: **gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer.** *Journal of leukocyte biology* 2010, **88**(6):1145-1156.
87. Vardam TD, Zhou L, Appenheimer MM, Chen Q, Wang WC, Baumann H, Evans SS: **Regulation of a lymphocyte-endothelial-IL-6 trans-signaling axis by fever-range thermal stress: hot spot of immune surveillance.** *Cytokine* 2007, **39**(1):84-96.
88. Hirano T, Ishihara K, Hibi M: **Roles of STAT3 in mediating the cell growth,**



- differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000, **19**(21):2548-2556.
89. Brandt C, Pedersen BK: **The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases.** *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, **2010**:520258.
  90. Heikkila K, Ebrahim S, Lawlor DA: **Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer.** *European journal of cancer* 2008, **44**(7):937-945.
  91. Lippitz BE: **Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review.** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(6):e218-228.
  92. Sansone P, Storci G, Tavorari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB *et al*: **IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(12):3988-4002.
  93. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D: **Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner.** *Cancer cell* 2010, **17**(2):135-147.
  94. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D *et al*: **Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, **12**(1):11-19.
  95. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F: **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.** *The Biochemical journal* 2003, **374**(Pt 1):1-20.
  96. Masuda M, Wakasaki T, Suzui M, Toh S, Joe AK, Weinstein IB: **Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers?** *Current cancer drug targets* 2010, **10**(1):117-126.
  97. Coussens LM, Werb Z: **Inflammation and cancer.** *Nature* 2002, **420**(6917):860-867.
  98. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, Huang S: **Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis.** *Oncogene* 2004, **23**(20):3550-3560.
  99. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY: **Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway.** *Oncogene* 2003, **22**(10):1517-1527.
  100. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H: **Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice.** *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(10):3367-3377.
  101. Oh K, Lee OY, Shon SY, Nam O, Ryu PM, Seo MW, Lee DS: **A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model.** *Breast cancer research : BCR* 2013, **15**(5):R79.
  102. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S: **Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells.** *Journal of immunology* 2009, **183**(2):937-944.
  103. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K *et al*: **IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation.** *Journal of immunology* 2004, **173**(6):3844-3854.
  104. Mu X, Shi W, Xu Y, Xu C, Zhao T, Geng B, Yang J, Pan J, Hu S, Zhang C *et al*: **Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer.** *Cell cycle*

- 2018:1-31.
105. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P: **Functional domains of the human estrogen receptor**. *Cell* 1987, **51**(6):941-951.
  106. McEwan IJ: **Nuclear receptors: one big family**. *Methods in molecular biology* 2009, **505**:3-18.
  107. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O: **Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(23):11162-11166.
  108. Briskin C, O'Malley B: **Hormone action in the mammary gland**. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(12):a003178.
  109. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG, Kushner PJ: **Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression**. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(27):24353-24360.
  110. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA: **Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11**. *Oncogene* 2005, **24**(44):6605-6616.
  111. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lakins J, Lupu R: **Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines**. *Oncology reports* 2000, **7**(1):157-167.
  112. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ: **Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review**. *Bioorganic chemistry* 2017.
  113. Acconcia F, Kumar R: **Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors**. *Cancer letters* 2006, **238**(1):1-14.
  114. Weigel NL, Zhang Y: **Ligand-independent activation of steroid hormone receptors**. *Journal of molecular medicine* 1998, **76**(7):469-479.
  115. McKenna NJ, O'Malley BW: **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators**. *Cell* 2002, **108**(4):465-474.
  116. Dutertre M, Smith CL: **Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains**. *Molecular endocrinology* 2003, **17**(7):1296-1314.
  117. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M: **Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription**. *Cell* 2000, **103**(6):843-852.
  118. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer**. *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(9):631-643.
  119. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G: **Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials**. *Lancet* 2005, **365**(9472):1687-1717.
  120. Shen Y, Costantino JP, Qin J: **Tamoxifen chemoprevention treatment and time to first diagnosis of estrogen receptor-negative breast cancer**. *Journal of the National Cancer Institute* 2008, **100**(20):1448-1453.
  121. Jordan VC, O'Malley BW: **Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(36):5815-5824.
  122. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R: **Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine**

- therapy resistance in breast cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(2 Pt 2):865s-870s.
123. Macedo LF, Sabnis G, Brodie A: **Preclinical modeling of endocrine response and resistance: focus on aromatase inhibitors.** *Cancer* 2008, **112**(3 Suppl):679-688.
  124. Sarwar N, Kim JS, Jiang J, Peston D, Sinnett HD, Madden P, Gee JM, Nicholson RI, Lykkesfeldt AE, Shousha S *et al*: **Phosphorylation of ERalpha at serine 118 in primary breast cancer and in tamoxifen-resistant tumours is indicative of a complex role for ERalpha phosphorylation in breast cancer progression.** *Endocrine-related cancer* 2006, **13**(3):851-861.
  125. Skliris GP, Nugent ZJ, Rowan BG, Penner CR, Watson PH, Murphy LC: **A phosphorylation code for oestrogen receptor-alpha predicts clinical outcome to endocrine therapy in breast cancer.** *Endocrine-related cancer* 2010, **17**(3):589-597.
  126. Dihge L, Bendahl PO, Grabau D, Isola J, Lovgren K, Ryden L, Ferno M: **Epidermal growth factor receptor (EGFR) and the estrogen receptor modulator amplified in breast cancer (AIB1) for predicting clinical outcome after adjuvant tamoxifen in breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 2008, **109**(2):255-262.
  127. Lu R, Hu X, Zhou J, Sun J, Zhu AZ, Xu X, Zheng H, Gao X, Wang X, Jin H *et al*: **COPS5 amplification and overexpression confers tamoxifen-resistance in ERalpha-positive breast cancer by degradation of NCoR.** *Nature communications* 2016, **7**:12044.
  128. Karmakar S, Foster EA, Blackmore JK, Smith CL: **Distinctive functions of p160 steroid receptor coactivators in proliferation of an estrogen-independent, tamoxifen-resistant breast cancer cell line.** *Endocrine-related cancer* 2011, **18**(1):113-127.
  129. McBryan J, Theissen SM, Byrne C, Hughes E, Cocchiglia S, Sande S, O'Hara J, Tibbitts P, Hill AD, Young LS: **Metastatic progression with resistance to aromatase inhibitors is driven by the steroid receptor coactivator SRC-1.** *Cancer research* 2012, **72**(2):548-559.
  130. Beeram M, Tan QT, Tekmal RR, Russell D, Middleton A, DeGraffenried LA: **Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2007, **18**(8):1323-1328.
  131. Ishii Y, Waxman S, Germain D: **Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3.** *Cancer research* 2008, **68**(3):852-860.
  132. Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL: **Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E.** *Endocrine-related cancer* 2005, **12** Suppl 1:S47-59.
  133. Nettles KW, Gil G, Nowak J, Metivier R, Sharma VB, Greene GL: **CBP Is a dosage-dependent regulator of nuclear factor-kappaB suppression by the estrogen receptor.** *Molecular endocrinology* 2008, **22**(2):263-272.
  134. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr.: **Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth.** *Molecular and cellular biology* 1997, **17**(7):3629-3639.
  135. Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, Iglehart JD: **NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(27):10137-10142.

136. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlincho S, Boissiere F, Laune D, Roques S, Lazennec G: **Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content.** *Breast cancer research : BCR* 2007, **9**(1):R15.
137. Yaal-Hahoshen N, Shina S, Leider-Trejo L, Barnea I, Shabtai EL, Azenshtein E, Greenberg I, Keydar I, Ben-Baruch A: **The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, **12**(15):4474-4480.
138. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK: **The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells.** *Endocrinology* 2000, **141**(9):3403-3411.
139. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA: **Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(15 Pt 1):4429-4434.
140. Slamon DJ, Clark GM: **Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors?** *Science* 1988, **240**(4860):1795-1798.
141. Plesner A: **Increasing the yield of human mononuclear cells and low serum conditions for in vitro generation of macrophages with M-CSF.** *Journal of immunological methods* 2003, **279**(1-2):287-295.
142. Oida K, Matsuda A, Jung K, Xia Y, Jang H, Amagai Y, Ahn G, Nishikawa S, Ishizaka S, Jensen-Jarolim E *et al*: **Nuclear factor-kB plays a critical role in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in human breast cancer cells.** *Scientific reports* 2014, **4**:4057.
143. Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K *et al*: **Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(19):6615-6625.
144. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C *et al*: **Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials.** *Lancet* 2011, **378**(9793):771-784.
145. Viedma-Rodriguez R, Baiza-Gutman L, Salamanca-Gomez F, Diaz-Zaragoza M, Martinez-Hernandez G, Ruiz Esparza-Garrido R, Velazquez-Flores MA, Arenas-Aranda D: **Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review).** *Oncology reports* 2014, **32**(1):3-15.
146. Bui QT, Im JH, Jeong SB, Kim YM, Lim SC, Kim B, Kang KW: **Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer.** *Cancer letters* 2017, **390**:115-125.
147. Teymourzadeh A, Mansouri S, Farahmand L, Hosseinzade A, Majidzadeh AK: **ER-alpha36 Interactions With Cytosolic Molecular Network in Acquired Tamoxifen Resistance.** *Clinical breast cancer* 2017, **17**(6):403-407.
148. Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P: **SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production.** *Journal of cellular biochemistry* 2017, **118**(2):397-406.
149. Vaziri-Gohar A, Zheng Y, Houston KD: **IGF-1 Receptor Modulates FoxO1-Mediated Tamoxifen Response in Breast Cancer Cells.** *Molecular cancer research : MCR* 2017, **15**(4):489-497.
150. Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N: **Down-regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6.** *The*

- Journal of biological chemistry* 2017, **292**(20):8136-8148.
151. Almatroodi SA, McDonald CF, Darby IA, Pouniotis DS: **Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC.** *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2016, **9**(1):1-11.
  152. Sawe RT, Kerper M, Badve S, Li J, Sandoval-Cooper M, Xie J, Shi Z, Patel K, Chumba D, Ofulla A *et al*: **Aggressive breast cancer in western Kenya has early onset, high proliferation, and immune cell infiltration.** *BMC Cancer* 2016, **16**:204.
  153. Xuan QJ, Wang JX, Nanding A, Wang ZP, Liu H, Lian X, Zhang QY: **Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients.** *Pathology oncology research : POR* 2014, **20**(3):619-624.
  154. Zhu P, Baek SH, Bourk EM, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Sanjo H, Akira S, Kotol PF, Glass CK, Rosenfeld MG *et al*: **Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway.** *Cell* 2006, **124**(3):615-629.
  155. Sica A, Mantovani A: **Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(3):787-795.
  156. Casella G, Garzetti L, Gatta AT, Finardi A, Maiorino C, Ruffini F, Martino G, Muzio L, Furlan R: **IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo.** *Journal of neuroinflammation* 2016, **13**(1):139.
  157. Oscar M. Pello, Maria De Pizzol, Massimiliano Mirolo, Laura Soucek, Luca Zammataro, Angelo Amabile, Doni A, Manuela Nebuloni, Lamorna B. Swigart, Gerard I. Evan *et al*: **Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology.** *Blood* 2012, **119**(2).
  158. Bonora M, Wieckowski MR, Chinopoulos C, Kepp O, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P: **Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition.** *Oncogene* 2015, **34**(12):1608.
  159. Zheng LH, Zhao YH, Feng HL, Liu YJ: **Endocrine resistance in breast cancer.** *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 2014, **17**(5):522-528.
  160. Gionet N, Jansson D, Mader S, Pratt MA: **NF-kappaB and estrogen receptor alpha interactions: Differential function in estrogen receptor-negative and -positive hormone-independent breast cancer cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2009, **107**(3):448-459.
  161. Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC: **Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo.** *Circ Res* 2001, **89**(9):823-830.
  162. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S: **Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity.** *Journal of molecular endocrinology* 2008, **40**(4):173-184.
  163. Anbalagan M, Rowan BG: **Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer.** *Molecular and cellular endocrinology* 2015, **418 Pt 3**:264-272.
  164. Xiong A, Yang Z, Shen Y, Zhou J, Shen Q: **Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention.** *Cancers* 2014, **6**(2):926-957.
  165. Ha H, Debnath B, Neamati N: **Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases.** *Theranostics* 2017, **7**(6):1543-1588.
  166. Kim S, Jeon M, Lee JE, Nam SJ: **MEK activity controls IL-8 expression in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells.** *Oncology reports* 2016, **35**(4):2398-2404.

167. Yang J, Wang Y, Gao Y, Shao J, Zhang XJ, Yao Z: **Reciprocal regulation of 17beta-estradiol, interleukin-6 and interleukin-8 during growth and progression of epithelial ovarian cancer.** *Cytokine* 2009, **46**(3):382-391.
168. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO: **Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication.** *Breast cancer* 2017, **24**(1):3-15.
169. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL: **A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors.** *BioMed research international* 2014, **2014**:130894.
170. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M: **NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition.** *Molecular and cellular biology* 1999, **19**(4):2690-2698.
171. Witzel, II, Koh LF, Perkins ND: **Regulation of cyclin D1 gene expression.** *Biochemical Society transactions* 2010, **38**(Pt 1):217-222.
172. Duplessis TT, Williams CC, Hill SM, Rowan BG: **Phosphorylation of Estrogen Receptor alpha at serine 118 directs recruitment of promoter complexes and gene-specific transcription.** *Endocrinology* 2011, **152**(6):2517-2526.
173. Liu XF, Bagchi MK: **Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(15):15050-15058.
174. McCartan D, Bolger JC, Fagan A, Byrne C, Hao Y, Qin L, McIlroy M, Xu J, Hill AD, Gaora PO *et al*: **Global characterization of the SRC-1 transcriptome identifies ADAM22 as an ER-independent mediator of endocrine-resistant breast cancer.** *Cancer research* 2012, **72**(1):220-229.
175. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H: **Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors.** *Cancer cell* 2009, **15**(4):283-293.
176. Theiss AL: **Sphingosine-1-phosphate: Driver of NFkappaB and STAT3 persistent activation in chronic intestinal inflammation and colitis-associated cancer.** *Jak-Stat* 2013, **2**(3):e24150.
177. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N: **Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment.** *Cancers* 2014, **6**(3):1670-1690.
178. Tariq M, Zhang J, Liang G, Ding L, He Q, Yang B: **Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer.** *Journal of cellular biochemistry* 2017, **118**(9):2484-2501.
179. Zheng X, Turkowski K, Mora J, Brune B, Seeger W, Weigert A, Savai R: **Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy.** *Oncotarget* 2017, **8**(29):48436-48452.
180. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A: **Cancer treatment and survivorship statistics, 2014.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2014, **64**(4):252-271.
181. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: **Global cancer statistics, 2012.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2015, **65**(2):87-108.
182. Hofvind S, Iversen BF, Eriksen L, Styr BM, Kjellevoid K, Kurz KD: **Mammographic morphology and distribution of calcifications in ductal carcinoma in situ diagnosed in organized screening.** *Acta radiologica* 2011, **52**(5):481-487.
183. Morgan MP, Cooke MM, McCarthy GM: **Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors?** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2005, **10**(2):181-187.

184. D'Orsi CJ, Reale FR, Davis MA, Brown VJ: **Is calcium oxalate an adequate explanation for nonvisualization of breast specimen calcifications?** *Radiology* 1992, **182**(3):801-803.
185. Surratt JT, Monsees BS, Mazoujian G: **Calcium oxalate microcalcifications in the breast.** *Radiology* 1991, **181**(1):141-142.
186. Morgan MP, Cooke MM, Christopherson PA, Westfall PR, McCarthy GM: **Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines.** *Molecular carcinogenesis* 2001, **32**(3):111-117.
187. Cooke MM, McCarthy GM, Sallis JD, Morgan MP: **Phosphocitrate inhibits calcium hydroxyapatite induced mitogenesis and upregulation of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1beta and cyclooxygenase-2 mRNA in human breast cancer cell lines.** *Breast cancer research and treatment* 2003, **79**(2):253-263.
188. Singh N, Theaker JM: **Calcium oxalate crystals (Weddellite) within the secretions of ductal carcinoma in situ--a rare phenomenon.** *Journal of clinical pathology* 1999, **52**(2):145-146.
189. Gonzalez JE, Caldwell RG, Valaitis J: **Calcium oxalate crystals in the breast. Pathology and significance.** *The American journal of surgical pathology* 1991, **15**(6):586-591.
190. Ozer E, Canda T, Balci P, Gokce O: **Calcium oxalate crystals in benign cyst fluid from the breast. A case report.** *Acta cytologica* 1999, **43**(2):281-284.
191. Cox RF, Hernandez-Santana A, Ramdass S, McMahon G, Harmey JH, Morgan MP: **Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralisation.** *British journal of cancer* 2012, **106**(3):525-537.
192. Bent CK, Bassett LW, D'Orsi CJ, Sayre JW: **The positive predictive value of BI-RADS microcalcification descriptors and final assessment categories.** *AJR American journal of roentgenology* 2010, **194**(5):1378-1383.
193. Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, Pistolesi CA, Spagnoli LG, Bonanno E: **Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics.** *BMC Cancer* 2014, **14**:286.
194. Panjwani P, Tirumalae R, Emmanuel A: **Calcium oxalate crystals--an unexpected finding in a breast aspirate.** *Diagnostic cytopathology* 2011, **39**(5):349-351.
195. Robertson DS: **The function of oxalic acid in the human metabolism.** *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2011, **49**(9):1405-1412.
196. Lange JN, Wood KD, Knight J, Assimos DG, Holmes RP: **Glyoxal formation and its role in endogenous oxalate synthesis.** *Advances in urology* 2012, **2012**:819202.
197. Baker PR, Cramer SD, Kennedy M, Assimos DG, Holmes RP: **Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells.** *American journal of physiology Cell physiology* 2004, **287**(5):C1359-1365.
198. Çalışkan M: **The metabolism of oxalic acid.** *Turkish Journal of Zoology* 2000, **24**(1):103-106.
199. Caliskan M, Subasi IE, Atak I, Erdem H, Sisik A, Ucankale H, Yilmaz MS, Kir G, Alimoglu O: **Hydatid cyst of the breast.** *The breast journal* 2011, **17**(2):203-204.
200. Koul S, Khandrika L, Pshak TJ, Iguchi N, Pal M, Steffan JJ, Koul HK: **Oxalate upregulates expression of IL-2Rbeta and activates IL-2R signaling in HK-2 cells, a line of human renal epithelial cells.** *American journal of physiology Renal physiology* 2014, **306**(9):F1039-1046.
201. Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK: **Genome wide analysis of differentially expressed genes in HK-2 cells, a line of human kidney**

- epithelial cells in response to oxalate.** *PloS one* 2012, **7**(9):e43886.
202. Koul S, Chaturvedi LS, Sekhon A, Bhandari A, Menon M, Koul HK: **Effects of oxalate on the re-initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells do not involve p42/44 MAP kinase activation.** *Kidney international* 2002, **61**(2):525-533.
  203. Maroni PD, Koul S, Meacham RB, Chandhoke PS, Koul HK: **Effects of oxalate on IMCD cells: a line of mouse inner medullary collecting duct cells.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1030**:144-149.
  204. Koul S, Huang M, Bhat S, Maroni P, Meacham RB, Koul HK: **Oxalate exposure provokes HSP 70 response in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells: protective role of HSP 70 against oxalate toxicity.** *Urological research* 2008, **36**(1):1-10.
  205. Huang MY, Chaturvedi LS, Koul S, Koul HK: **Oxalate stimulates IL-6 production in HK-2 cells, a line of human renal proximal tubular epithelial cells.** *Kidney international* 2005, **68**(2):497-503.
  206. Gil GA, Silvestre DC, Tomasini N, Bussolino DF, Caputto BL: **Controlling cytoplasmic c-Fos controls tumor growth in the peripheral and central nervous system.** *Neurochemical research* 2012, **37**(6):1364-1371.
  207. Bussolino DF, Guido ME, Gil GA, Borioli GA, Renner ML, Graboys VR, Conde CB, Caputto BL: **c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001, **15**(3):556-558.
  208. Caputto BL, Cardozo Gizzi AM, Gil GA: **c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1841**(9):1241-1246.
  209. Gil GA, Bussolino DF, Portal MM, Alfonso Pecchio A, Renner ML, Borioli GA, Guido ME, Caputto BL: **c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells.** *Molecular biology of the cell* 2004, **15**(4):1881-1894.
  210. Chaturvedi LS, Koul S, Sekhon A, Bhandari A, Menon M, Koul HK: **Oxalate selectively activates p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signal transduction pathways in renal epithelial cells.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(15):13321-13330.
  211. Liska V, Holubec L, Jr., Treska V, Vrzalova J, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Bruha J, Vycital O, Finek J *et al*: **Evaluation of tumour markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer.** *Anticancer research* 2011, **31**(4):1447-1451.
  212. Motrich RD, Castro GM, Caputto BL: **Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm.** *PloS one* 2013, **8**(1):e53211.
  213. Allinen M, Beroukhir R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A *et al*: **Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer.** *Cancer cell* 2004, **6**(1):17-32.
  214. Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC: **Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression.** *Breast cancer research : BCR* 2009, **11**(1):R7.
  215. Jiang X, Shapiro DJ: **The immune system and inflammation in breast cancer.** *Molecular and cellular endocrinology* 2014, **382**(1):673-682.
  216. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, Wang Y, Battula VL, Mak PY, Schallmoser K *et al*: **Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance.** *Blood* 2014, **123**(17):2691-2702.
  217. Bonapace L, Coissieux MM, Wyckoff J, Mertz KD, Varga Z, Junt T, Bentires-Alj



- 
- M: **Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis.** *Nature* 2014, **515**(7525):130-133.
218. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, Azzam DJ, Twyman-Saint Victor C, Wiemann BZ, Ishwaran H *et al*: **Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways.** *Cell* 2014, **159**(3):499-513.
219. Battaglia M, Pozzi D, Grimaldi S, Parasassi T: **Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching.** *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 1994, **69**(3):152-156.
220. Peredeltchouk M, David SA, Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V: **Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays.** *Journal of applied microbiology* 2011, **110**(1):54-60.
221. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C: **M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide.** *BMC Cancer* 2015, **15**:577.
222. Attia MA, Weiss DW: **Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus.** *Cancer research* 1966, **26**(8):1787-1800.
223. Bland JM, Altman DG: **The logrank test.** *Bmj* 2004, **328**(7447):1073.